

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

CAIO CÉSAR DE SOUZA ALVES

**EFEITO DE DERIVADOS ANTRAQUINÔNICOS ANÁLOGOS DA
MITOXANTRONA NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE:
MODELO DE ENCEFALOMIELITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL E
DE ALERGIA PULMONAR**

JUIZ DE FORA

2012

CAIO CÉSAR DE SOUZA ALVES

**EFEITO DE DERIVADOS ANTRAQUINÔNICOS ANÁLOGOS DA
MITOXANTRONA NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE: MODELO DE
ENCEFALOMIELITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL E DE ALERGIA
PULMONAR**

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

Orientador: Prof^ª. Dra. Ana Paula Ferreira

JUIZ DE FORA

2012

Alves, Caio César de Souza.

Efeito de derivados antraquinônicos análogos da mitoxantrona na modulação da resposta imune : modelo de encefalomielite autoimune experimental e de alergia pulmonar / Caio César de Souza Alves. – 2012.

114 f. : il.

Tese (Doutorado em Saúde)–Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2012.

1. Asma. 2. Alergia e imunologia. 3. Mitoxantrona. I. Título.

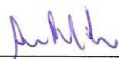
CDU 616.248

CAIO CÉSAR DE SOUZA ALVES

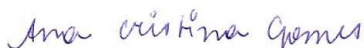
EFEITO DE DERIVADOS ANTRAQUINÔNICOS ANÁLOGOS DA
MITOXANTRONA NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE: MODELO DE
ENCEFALOMIELITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL E DE ALERGIA
PULMONAR

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

BANCA EXAMINADORA



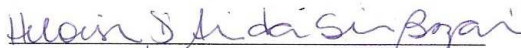
Profª. Dra. Ana Paula Ferreira,
Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, UFJF.



Profª. Dra. Ana Cristina Gomes Santos,
Laboratório de Imunobiologia, UFMG.



Prof. Dr. Leonardo Araújo Pinto,
Faculdade de Medicina, Instituto de Pesquisas Biomédicas, PUCRS.



Profª. Dra. Heloisa D'Avila da Silva Bizarro,
Departamento de Biologia, UFJF.



Prof. Dr. José Otávio do Amaral Corrêa,
Faculdade de Farmácia e Bioquímica, UFJF.

**À memória de Antônio Carlos e Marília
e para Edna e Marco Túlio
*One stick is weak, five are unbreakable.***

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que tornaram este trabalho possível e que involuntariamente omitimos os nomes;

A Profa. Ana Paula pelo acolhimento, confiança, dedicação, ensinamentos durante todos esses anos e por ser minha segunda mãe;

Ao Prof. Henrique pela confiança, os ensinamentos, a parceria e o apoio despendido;

Ao Prof. Joerg Mattes e Ana Lucia pelo auxílio, dedicação e compreensão durante todo o período australiano;

A amiga Letícia por ter apresentado a imunologia;

A Profa. Maria Aparecida por todos os ensinamentos e palavras de incentivo;

A todos os amigos e companheiros de laboratório por terem suportado os dias difíceis e de caos, estarem presentes nos momentos de apoio e durante todos os extensos e extenuantes experimentos, fugindo ao protocolo, peço desculpas por não poder agradecer individualmente a cada um de vocês, pois seriam páginas e mais páginas de agradecimentos;

A amiga e parceira Sandra, por ter aturado, compreendido e muitas vezes aceitado, por todo apoio e incentivo para a construção desta tese;

A minha esposa Sabrina, por compreender, apoiar e não desistir mesmo após os experimentos que entraram noite afora ou durante o período australiano, por ser companheira e amiga nas horas difíceis e por ter ajudado a colher os frutos de mais uma conquista.

“Eu tentei uma dúzia de modificações que foram rejeitadas.

Mas todas elas serviram como um caminho para o design final.”

Mikhail Kalashnikov

Resumo

A mitoxantrona é um agente antineoplásico da família das antracenodionas, capaz de reduzir o número de células T, suprimir a imunidade humoral e *in vivo* ativar células T supressoras. A Esclerose Múltipla (EM) afeta mais de um milhão de pessoas em todo o mundo, caracterizando-se por ser uma doença inflamatória crônica desmielinizante do sistema nervoso central, de natureza auto-imune, sendo, na maioria dos casos, grave e incapacitante. Além disso, a terapêutica atual para a EM frequentemente tem efeitos insatisfatórios, mostrando-se ainda ineficaz em relação à sua cura e total recuperação dos pacientes em fase avançada. A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas que afeta cerca de 300 milhões de pessoas em todo o mundo. Atualmente, os medicamentos disponíveis para o tratamento da asma apenas controlam da doença e apresentam efeitos colaterais sistêmicos que, em geral, são observados com a utilização de doses elevadas por tempo prolongado. Dentro deste contexto, este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito de uma série de derivados antraquinônicos análogos da mitoxantrona na modulação da resposta *in vitro* de macrófagos murinos ativados com lipopolissacarídeo e IFN- γ , e verificar a ação na modulação da resposta imune *in vivo* no modelo de encefalomielite autoimune experimental (EAE) e de alergia pulmonar (AP). Na etapa *in vitro* foi avaliada a citotoxicidade dos compostos e nos sobrenadantes da cultura foram quantificados os níveis de óxido nítrico. Na etapa *in vivo* foi investigado o uso do derivado *O,O'*-di-(3'-iodopropil)-1,4-dihidroxi-antraquinona (CS56) na evolução da EAE induzida em camundongos C57Bl/6 através da aplicação do MOG₃₅₋₅₅, e na modulação da AP e da exacerbação por vírus da AP, induzidas em camundongos BALB/c por inalação de alérgenos da poeira. Os resultados obtidos demonstraram que as modificações estruturais realizadas nos derivados antraquinônicos originaram análogos menos citotóxicos, com elevada capacidade de inibir a concentração de NO. Os dados obtidos *in vivo* indicam que o tratamento da EAE com o CS56 melhora o escore clínico da doença e isto pode ser correlacionado com uma redução na liberação de citocinas inflamatórias e quimiocinas envolvidas no aumento de células no sistema nervoso central. Os resultados obtidos do modelo de AP demonstram que o tratamento com CS56 melhora o quadro respiratório dos camundongos através da redução dos parâmetros da alergia pulmonar, como hiperresponsividade brônquica, hipersecreção de muco e infiltração de eosinófilos. Desta forma, os dados sugerem um papel imunomodulatório do derivado na EAE e na AP com potencial aplicabilidade terapêutica para a asma e a esclerose múltipla.

Abstract

Mitoxantrone is an antineoplastic agent of the anthracenedione family, capable of reduce T cell numbers, suppress humoral immunity and *in vivo* activate suppressor T cells. Multiple Sclerosis (MS) affects about one million people worldwide, is characterized by an autoimmune chronic inflammatory demyelinating disease of the central nervous system, and, in most cases, severe and disabling. Moreover, the current therapy for MS has often unsatisfactory effects, being still ineffective in relation to its healing and full recovery of patients in advanced stages. Asthma is a chronic inflammatory disease of the airways that affects approximately 300 million people worldwide. Currently, the treatment of asthma is intended to control the disease and the drugs used show systemic side effects that are generally observed with the use of high doses for long time. In this context, this study aimed to evaluate the effect of a series of anthraquinone derivatives, analogs of mitoxantrone, in the modulation of *in vitro* response of murine macrophages activated with lipopolysaccharide and IFN- γ , and check the action in the modulation of the *in vivo* immune response of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) and pulmonary allergy (PA). In the *in vitro* stage was evaluated the cytotoxicity of the compounds and the levels of nitric oxide produced. In the *in vivo* stage, the *O,O'*-bis-(3'-iodopropyl)-1,4-dihydroxyanthraquinone (CS56) derivative was investigated in the evolution of EAE induced in C57Bl/6 mice by applying MOG₃₅₋₅₅, and in the modulation of PA and PA exacerbation by Rhinovirus, induced in BALB/c mice by inhalation of dust allergens. The results showed that the structural modifications performed on the anthraquinone derivatives produced less cytotoxic analogs with high ability to inhibit the NO concentration. The data obtained *in vivo* indicate that treatment of EAE with CS56 improves the clinical score of disease and this may be correlated with a reduction in the release of inflammatory cytokines and chemokines involved in the increase of cells in the central nervous system. The results of PA model demonstrate that treatment with CS56 improves respiratory mice by reducing the parameters of pulmonary allergy, such as bronchial hyperresponsiveness, mucus hypersecretion and infiltration of eosinophils. Thus, the data suggest an immunomodulatory role of the derivative in EAE and PA with potential therapeutic applicability for asthma and multiple sclerosis.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
ASPECTOS GERAIS DA MITOXANTRONA	12
PARTE I.....	14
AÇÃO DO DERIVADO CS56 NA ENCEFALOMIELE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL.....	14
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
1.1 ASPECTOS GERAIS DA ESCLEROSE MÚLTIPLA	15
1.2 ENCEFALOMIELE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL (EAE).....	17
1.3 TRATAMENTO DA EM.....	19
2 OBJETIVOS	22
2.1 OBJETIVOS GERAIS	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1 SÍNTESE DOS ANÁLOGOS	25
3.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS ANÁLOGOS DA MITOXANTRONA EM MACRÓFAGOS ESTIMULADOS COM LPS E IFN- γ	26
3.2.1 LINHAGEM CELULAR E CULTURA	26
3.2.2 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA MITOXANTRONA E SEUS ANÁLOGOS	26
3.2.3 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE NO	27
3.3 AVALIAÇÃO DO DERIVADO CS56 NO MODELO IN VIVO DE EAE	27
3.3.1 ANIMAIS	27
3.3.2 INDUÇÃO DA EAE.....	28
3.3.3 TRATAMENTO COM MITOXANTRONA E ANÁLOGOS.....	28
3.3.4 AVALIAÇÃO CLÍNICA	28
3.3.5 OBTENÇÃO DE PLASMA, ÓRGÃOS E CÉLULAS	30
3.3.6 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	30
3.3.7 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS POR ELISA	30
3.3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
4 RESULTADOS	32
4.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS ANÁLOGOS DA MITOXANTRONA NA VIABILIDADE CELULAR E PRODUÇÃO DE NO EM MACRÓFAGOS ESTIMULADOS COM LPS E IFN- γ	33
4.2 AVALIAÇÃO DO CURSO CLÍNICO DA EAE.....	35

4.3 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DA MEDULA ESPINHAL	37
4.4 DOSAGEM DE CITOCINAS NA MEDULA	39
4.5 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE QUIMIOCIAS NA MEDULA.....	41
5 DISCUSSÃO	43
6 CONCLUSÃO	47
7 REFERÊNCIAS	49
PARTE II	58
AÇÃO DO DERIVADO CS56 NO MODELO DE ALERGIA PULMONAR.....	58
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	59
1.1 ASMA	59
1.2. RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA ASMA	59
1.3. MODELO MURINO DE ASMA	61
1.4. TRATAMENTO DA ASMA	61
2 OBJETIVOS	63
2.1 OBJETIVO GERAL.....	64
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	64
3 MATERIAL E MÉTODOS	65
3.1 ANIMAIS	66
3.2 INDUÇÃO E EXACERBAÇÃO DA ALERGIA PULMONAR (AP).....	66
3.3 TRATAMENTO COM MITOXANTRONA E CS56.....	67
3.4 AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DAS VIAS AÉREAS.....	67
3.5 OBTENÇÃO DE ÓRGÃOS E CÉLULAS	67
3.6 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	68
3.7 CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DO LBA	68
3.8 ANÁLISE QUANTITATIVA DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (QRT-PCR) PARA AVALIAÇÃO DE CITOCINAS E FATORES DE TRANSCRIÇÃO.....	69
3.9 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS NOS LINFONODOS PERIBRONQUIAIS.....	70
3.10 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MARCADORES EM CÉLULAS PULMONARES E DOS LINFONODOS PERIBRONQUIAIS.....	70
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	70
4 RESULTADOS	72
4.1 AVALIAÇÃO DA HIPERRESPONSIVIDADE BRONQUICA (HRB).....	73
4.2 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DO PULMÃO	75

4.3 AVALIAÇÃO DA CONTAGEM CELULAR NO LAVADO BRONCOALVEOLAR (LBA)	77
4.4 EXPRESSÃO DE RNAm POR qRT-PCR	79
4.5 AVALIAÇÃO DE CITOCINAS NO SOBRENADANTE DE CULTURA DOS LINFONODOS PERIBRONQUIAIS	83
4.6 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MARCADORES CELULARES.....	85
4.7 AVALIAÇÃO DA HRB NA EXACERBAÇÃO DA AP.....	87
4.8 AVALIAÇÃO DA CONTAGEM CELULAR NO LBA NA EXACERBAÇÃO DA AP	89
4.9 CONTAGEM DO NÚMERO DE CÓPIAS VIRAIS NA EXACERBAÇÃO DA AP ...	91
5 DISCUSSÃO	93
6 CONCLUSÃO	97
7 REFERÊNCIAS	99
ANEXOS.....	105
ANEXO A - ARTIGOS PUBLICADOS.....	106
ANEXO B - ARTIGOS SUBMETIDOS.....	113
ANEXO C - CARTA PDEE.....	114

INTRODUÇÃO

ASPECTOS GERAIS DA MITOXANTRONA

A mitoxantrona (Figura 1) foi desenvolvida nos anos de 1970 como agente antineoplásico, sendo derivado da família das antracenedionas (SCOTT; FIGGITT, 2004) que são quimicamente análogas as antraciclina que incluem a doxarrubicina e a daunorrubicina (MORRISSEY; LE PAGE; EDAN, 2005).

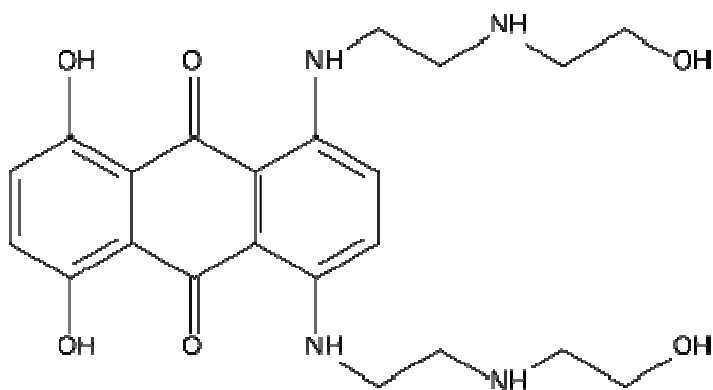


Figura 1 – Estrutura química da mitoxantrona (BARASCH et al., 1999).

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

A mitoxantrona é uma substância imunossupressora capaz de inibir a imunidade humoral, reduzir o número de células T e ativar *in vivo* células T supressoras (PERICOT; MONTALBAN, 2003). Sua atividade imunossupressora têm sido atribuída a sua capacidade de reduzir a secreção de interferon – gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 2 (IL-2) (FOX, 2004). Morrissey, Le Page e Edan (2005) observaram a capacidade da mitoxantrona em induzir de forma dose-dependente a apoptose e necrose de linfócitos B e células apresentadoras de antígenos. No tratamento de pacientes com esclerose múltipla, presume-se que a ação da mitoxantrona seja via depleção de linfócitos T e B auto reativos à

mielina, redução da desmielinização causada por macrófagos e da liberação de anticorpos anti-mielina (SCOTT; FIGGITT, 2004; FOX, 2006).

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

Apesar de ser bem tolerada, em altas doses a mitoxantrona pode provocar efeitos secundários como mielossupressão caracterizada por leucopenia e neutropenia (6% - 50%), com efeito mínimo sobre as plaquetas e eritrócitos. A granulocitopenia pode resultar de leve a severas infecções, incluindo infecções no trato urinário (7%), pneumonia (9%), bacteremia/sepsis (34%) e infecções fúngicas (9% - 15%). Ocasionalmente o paciente em tratamento com a mitoxantrona podem apresentar náuseas e vômito (31% - 72%), alopecia e estomatite (7% - 29%). Entretanto, a cardiotoxicidade (5% - 18%) é o efeito mais grave atribuído ao uso de mitoxantrona induzindo cardiomiopatias, como taquicardia, arritmia e insuficiência cardíaca congestiva sintomática (PERICOT; MONTALBAN, 2003). O aumento do risco de cardiotoxicidade está associado com o aumento cumulativo das doses de mitoxantrona, assim como, com a pré-disposição a doenças cardiovasculares (MORRISSEY; LE PAGE; EDAN, 2005).

PARTE I

**AÇÃO DO DERIVADO CS56 NA ENCEFALOMIELITE
AUTOIMUNE EXPERIMENTAL**

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 ASPECTOS GERAIS DA ESCLEROSE MÚLTIPLA

A Esclerose Múltipla (EM) afeta cerca de 1,3 milhões de indivíduos em todo o mundo com uma incidência aproximada de 7 novos casos por ano para cada 100.000 pessoas (VOLLMER, 2007). O início da doença é principalmente observado entre 20 e 40 anos, mas 10% dos pacientes são diagnosticados antes dos 16 anos. Embora os dados atuais da EM tenham como base trabalhos europeus e norte americanos, estudos brasileiros objetivam uma melhor caracterização epidemiológica, assim como, sua diferenciação em relação a outras doenças clinicamente semelhantes, como a neuromielite óptica. Os estudos nacionais demonstram um perfil de pacientes com EM predominantemente caucasianos, mulheres, apresentando a forma clínica remittente recorrente (ARRUDA et al., 2001; ALVES-LEON et al., 2008; LANA-PEIXOTO, 2008).

Atualmente, existem duas hipóteses para a etiologia da EM: A hipótese infecciosa viral e a hipótese autoimune. Elas são complementares uma vez que experimentos utilizando modelos animais com base em tais hipóteses mostram degeneração axonal, como o fator determinante da incapacidade neurológica irreversível, assim como, ocorre em pacientes com EM (GRIGORIADIS; HADJIGEORGIOU, 2006).

De acordo com a hipótese infecciosa viral, após a infecção os vírus ativam as células apresentadoras de antígenos (APCs), estes vírus (causadores, por exemplo, de sarampo, rubéola, entre outros) contêm seqüências protéicas similares às seqüências dos antígenos da mielina (mimetismo molecular) e, em hospedeiros susceptíveis, ocorre reação cruzada, ou seja, respostas imunológicas contra o vírus que resultam em reações contra os próprios tecidos (GRIGORIADIS; HADJIGEORGIOU, 2006, BRETTSCHEIDER et al., 2009).

Na hipótese autoimune o processo de desmielinização inicia-se com ativação de células T CD4⁺ periféricas com reatividade à mielina que atravessam a barreira hematoencefálica em direção ao SNC auxiliadas por um aumento na expressão de citocinas inflamatórias e de moléculas de adesão e receptores de quimiocinas nas células endoteliais desta barreira (RANSOHOFF; KIVISAKK; KIDD, 2003). Os auto-antígenos da mielina, sobretudo a Proteína Básica da Mielina (PBM) e a Glicoproteína Mielodendrítica (MOG) são apresentados por astrócitos, macrófagos e células gliais à estas células T CD4⁺,

desencadeando uma cascata que libera mediadores inflamatórios e culmina com a lesão ou destruição da bainha de mielina (RANSOHOFF; KIVISAKK; KIDD, 2003). A figura 2 resume todo este processo (NEUHAUS; ARCHELOS; HARTUNG, 2003).

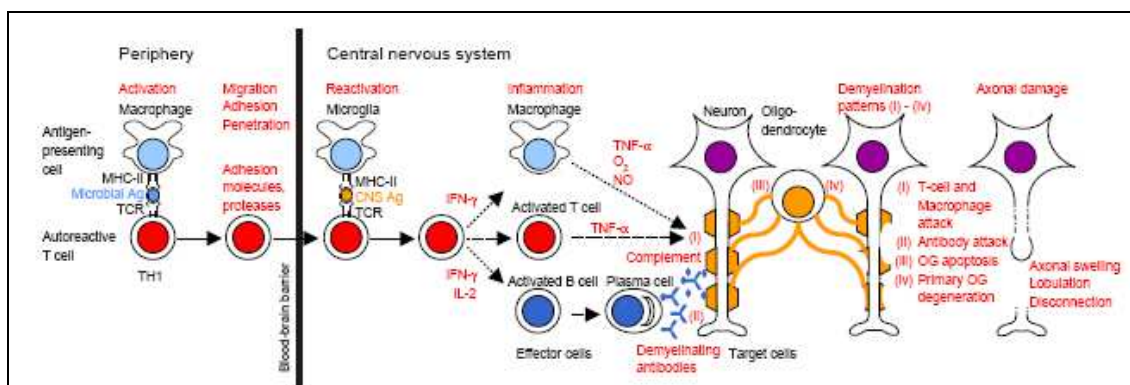


Figura 2 - Hipótese auto-imune da Esclerose múltipla (Fonte: NEUHAUS; ARCHELOS; HARTUNG, 2003).

De acordo com dados atuais, a EM se desenvolve em pessoas geneticamente susceptíveis, podendo ser necessários gatilhos ambientais como, por exemplo, temperatura, níveis de vitamina D, dieta alimentar e fumo (LINCOLN, COOK, 2009). Indivíduos que possuem parentes de primeiro grau portadores de EM, têm uma probabilidade de 2 a 5% maior de desenvolver a doença do que o restante da população, enquanto que entre gêmeos monozigóticos este risco é de 25% (DYMENT; EBERS; SADOVNICK, 2004).

Similar a outras doenças autoimunes mediadas por células T, os genes que conferem risco específico para EM são da classe II do antígeno leucocitário humano (HLA)-DR e o HLA-DQ. O maior risco ocorre nos indivíduos homocigóticos para os alelos DR15 e DR2. Existem poucas informações com relação ao risco genético conferido pelos alelos HLA de classe I (SOSPEDRA; MARTIN, 2005).

Os sintomas mais comuns da EM são fraqueza muscular, parestesias, deficiências visuais e/ou auditivas, alterações na coordenação motora e no controle dos movimentos finos, alterações urinárias e/ou sexuais, vertigens e/ou desequilíbrios, dores faciais, no tronco e/ou nas extremidades, disartria e/ou disfagia, entre outros. É mais comum em mulheres, sendo que as primeiras manifestações clínicas ocorrem frequentemente na idade adulta (HAFLER, 2004). Sabe-se que 15 anos após o início da doença, cerca de 50% dos pacientes necessitam de auxílio para caminhar, e após 25 anos a maioria está incapacitada para andar. Estas características parecem se relacionar com o número e a gravidade dos surtos nos primeiros

anos da doença, neste sentido o diagnóstico e o tratamento precoce são imprescindíveis (TILBERY, 2007).

As manifestações clínicas na EM incluem problemas sensoriais, motor e no sistema autônomo, sendo possível distinguir basicamente quatro formas clínicas da doença. No estágio inicial da doença 85% dos pacientes apresentam o tipo remitente-recorrente (RR), onde os surtos são de duração variável, seguidos de um período de remissão e com recuperação total ou parcial do indivíduo afetado; a maioria dos pacientes do tipo RR evolui para a forma secundária-progressiva (SP), onde após a remissão dos surtos, apresentam leve progressão da doença. Aproximadamente 10% dos pacientes apresentam a EM primária-progressiva (PP) que inicia de forma progressiva, com platôs ocasionais e com pequenas melhoras temporárias. Na apresentação progressiva-recorrente (PR) desde o início observa-se o agravamento da incapacidade com surtos claramente identificáveis com ou sem recuperação do paciente (SOSPEDRA; MARTIN, 2005; LUBLIN, 2007; GOVERMAN, 2009).

1.2 ENCEFALOMIELE ENDOGENA EXPERIMENTAL (EAE)

Os estudos de desordens neuroinflamatórias do SNC em pacientes é restrito devido a dificuldade de acesso ao órgão, sendo as investigações limitadas às alterações sistêmicas que ocorrem durante a progressão da enfermidade e a exames de ressonância, sendo que estes não refletem todas as mudanças que desencadeiam o processo patológico no SNC e isto explica, em parte, a falta de terapias efetivas contra a EM.

Na tentativa de superar estas limitações o uso de modelo animal torna-se necessário para o estudo da patogênese da EM e também para o desenvolvimento de terapias efetivas no tratamento desta patologia, pois os animais fornecem estudos que podem conduzir ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento da EM (HART; AMOR, 2003).

A EAE é o modelo animal mais amplamente utilizado para o estudo da EM, sendo que várias razões contribuem para a utilização da EAE como um modelo de autoimunidade antígeno-induzida, tais como, o predomínio de inflamação com o envolvimento de células mononucleares e a desmielinização que são características que se assemelham às da EM (ERCOLINI; MILLER, 2006; YIN et al., 2010).

Inicialmente a EAE, assim como a EM, foi caracterizada como sendo uma doença mediada por linfócitos CD4+ T helper 1 (Th1) e a produção de citocinas relacionadas a este tipo celular, como produção de interferon- γ (IFN- γ) e interleucina (IL)-12 (MARCONDES et al., 2005; SOSPEDRA e MARTIN, 2005; WENSKY, 2005). Lees e colaboradores (2008) em estudo de transferência adotiva de células polarizadas em Th1 inoculados em camundongos tipo selvagem, deficientes em IFN- γ e deficientes em receptores para IFN- γ avaliaram a importância do IFN- γ no estabelecimento de um infiltrado celular e consequente desenvolvimento de lesões na medula espinhal, mas não no cerebelo e tronco encefálico, estabelecendo assim uma ação localizada do IFN- γ na patogênese da EAE.

Atualmente sabe-se que linfócitos T helper 17 (Th17), produtores de IL-17 estariam diretamente relacionados com o desenvolvimento da EAE (MURPHY et al., 2010; KANG et al., 2010;). A polarização de linfócitos Th17 ocorre na presença de IL-23, IL-6 e do fator transformador do crescimento-beta (TGF- β). Em protocolos experimentais utilizando camundongos geneticamente deficientes em IL-6 e IL-23 não foi possível induzir a EAE, indicando a importância destas citocinas no desenvolvimento da patologia e consequentemente dos linfócitos Th17 (KROENKE, 2008; QUINTANA; WEINER, 2009).

O modelo murino C57Bl/6 tem sido bastante útil na indução de EAE crônica, severa e sem recaídas, especialmente quando se utiliza a mielina do oligodendrócito (MOG) como indutora da doença (SOSPEDRA; MARTIN, 2005).

Este modelo pode ser induzido através de componentes da PBM, da MOG ou da Proteína Proteolipídica (PLP) (Figura 3) que, depois de extraídos e purificados, são emulsificados e injetados nos animais susceptíveis (GRIGORIADIS; HADJIGEORGIOU, 2006).

PEPTÍDEO	LINHAGEM
MOG 35-55	C57BL/6 e rato Lewis
MOG 92-106	SJL/J
MBP nativa	Rato Lewis
MBP 87-89	SJL/J e SWR/J
PLP 139-151	SJL/J e SWX/J
PLP 178-191	SWX/J

Figura 3 - Seqüências indutoras do modelo de EAE e respectivas linhagens.

As formas clínicas da EAE podem variar de acordo com o protocolo de indução utilizado. A indução com PBM desenvolve a forma progressiva primária da EAE, já com o uso da PLP, observa-se a forma secundária progressiva enquanto que o peptídeo MOG induz a forma recorrente-remitente da EAE. A glicoproteína MOG é expressa no SNC e está localizada nos corpos celulares e processos dos oligodendrócitos e na camada mais externa da bainha de mielina. Em função desta localização a MOG tem sido objeto de estudos que apóiam a possibilidade dela ser o antígeno-alvo primário no desenvolvimento da EM (SOSPEDRA; MARTIN, 2005).

1.3 TRATAMENTO DA EM

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

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

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

O acetato de glatirâmer (AG) é frequentemente utilizado no tratamento da EM, sendo composto de L-tirosina, L-lisina, L-alanina e L-tirosina. Estudo realizado por Neuhaus, Archelos e Hartung (2003) demonstraram que o acetato de glatirâmer atua polarizando a diferenciação de células T CD4+ para o perfil Th2. Kim e colaboradores (2004) demonstraram que monócitos isolados de pacientes tratados com acetato de glatirâmer produzem uma maior quantidade de IL-10 e baixa quantidade da citocina pró-inflamatória IL-12. Recentemente, Burger e colaboradores (2009) demonstraram que o acetato de glatirâmer aumenta o antagonista endógeno de IL-1 β , denominado sIL-1Ra reduzindo a indução de células T por IL-1 β . O tratamento com AG pode levar a reações no local de aplicação (30%), sintomas de gripe (10%), dores abdominais (14% - 20%), infecções (25% - 30%) e taquicardia, palpitação (4% - 20%). O custo mensal do tratamento varia de R\$ 2.200,00 a R\$ 6.000,00 (CHIAO; MEYER, 2009; BOSTER, 2011).

O natalizumab é um anticorpo monoclonal IgG4 que impede a migração de células através da barreira hematoencefálica por se ligar à integrina alfa 4 beta 1 (VLA-4) presente em linfócitos. A ligação do natalizumab em VLA-4 impede sua interação com seu ligante a molécula de adesão VCAM-1, expressa pelo endotélio vascular (ELICES et al., 1990). O tratamento com natalizumab pode levar a sintomas de gripe (10% - 25%), dores abdominais (8% - 28%), infecções (30%) e depressão (4% - 8%). O custo mensal do tratamento varia de R\$ 6.000,00 a R\$ 7.200,00 (CHIAO; MEYER, 2009; O'DAY et al., 2011).

O fingolimod é um agonista do receptor esfingosina-1-fosfato que está presente em linfócitos e regula sua migração para os órgãos linfoides secundários. A intensa estimulação do receptor esfingosina promove a internalização deste receptor e conseqüentemente, as

células ficam privadas dos sinais de migração (SAWICKA et al., 2005). O tratamento com fingolimod pode levar a sintomas graves como falha cardíaca e infecções severas. O custo mensal do tratamento varia de R\$ 7.000,00 a R\$ 9.200,00 (O'DAY et al., 2011).

O daclizumab é um anticorpo monoclonal IgG1 humanizado que se liga a cadeia α do receptor de IL-2 (BIELEKOVA et al., 2006). A ação do daclizumab no controle de células T esta relacionada à expansão e sobrevivência de células T matadoras naturais (NK). Estas células NK exerceriam um efeito imunomodular sobre as células T por meio de um contato entre as duas células. Bielekova e colaboradores (2006) apresentam que células mononucleares do sangue periférico quando tratadas com daclizumab atuam promovendo a expansão e sobrevivência de células NK e estas por sua vez seriam responsáveis pela morte de célula T ativada. Pacientes com EM tratados com daclizumab apresentam uma correlação significativa entre células NK e declínio de linfócitos T CD4 e linfócitos T CD8. A administração do daclizumab atua reforçando a citotoxicidade de células NK sobre células T ativadas (BIELEKOVA et al., 2006). O tratamento com daclizumab pode levar a sintomas graves como falha cardíaca e sangramentos. O custo mensal do tratamento varia de R\$ 5.000,00 a R\$ 7.000,00 (O'DAY et al., 2011).

A mitoxantrona atua principalmente na periferia, onde causa a inibição das APCs e de linfócitos T auto-reativos, e no SNC, inibe os mecanismos efetores de macrófagos e linfócitos B (NEUHAUS; KIESEIER; HARTUNG, 2004).

Embora todos estes fármacos apresentem resultados promissores no tratamento da EM, eles são ineficazes na cura do paciente em fase evolutiva da doença. Além disso, estes fármacos apresentam um problema fundamental que é sua atuação não seletiva nas células do sistema imune, o que desencadeia efeitos colaterais graves como leucoencefalopatia multifocal progressiva, aumento das taxas de infecções, erupções cutâneas e úlceras (JONES; COLES, 2010).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o efeito do derivado antraquinônico *O,O'*-di-(3'-iodopropil)-1,4-dihidroantraquinona (CS56), análogo da mitoxantrona na modulação da resposta imune no modelo de encefalomielite autoimune experimental.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar o efeito dos derivados antraquinônicos na viabilidade de macrófagos;
- ✓ Quantificar a produção de NO em sobrenadantes de cultura de macrófagos estimulados com IFN- γ e LPS e tratados com os derivados antraquinônicos;
- ✓ Avaliar a evolução do quadro de sintomas da EAE, através do peso e escore clínico dos animais;
- ✓ Avaliar o infiltrado celular no cérebro e na medula espinhal, através da histopatologia;
- ✓ Quantificar os níveis de citocinas e quimiocinas em macerado de cérebro, e medula espinhal através da técnica de ELISA.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 SÍNTESE DOS ANÁLOGOS

Os análogos foram sintetizados no Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), e gentilmente cedidos para estudo pelo grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Dr. Mauro Vieira de Almeida. A mitoxantrona foi cedida pela Quiral Química do Brasil S.A.. Inicialmente obteve-se o composto antraquinona que foi modificado para dois compostos intermediários, a diaminoantraquinona e a dihidroxiantraquinona. Após diferentes reações foi obtida a substituição dos radicais pelos diferentes compostos que deram origem aos derivados antraquinônicos análogos da mitoxantrona (Figura 4). A mitoxantrona também é um derivado da antraquinona, na qual envolve a reação da leuco-1,4,5,8-tetrahidroxiantraquinona com 2-[(2-aminoetil)amino]etanol para formar a 1,4-dihidroxi-6,7-dihidro-5,8-di[2-[(2-hidroxi)etil]amino]amino]-9,10-antracenediona.

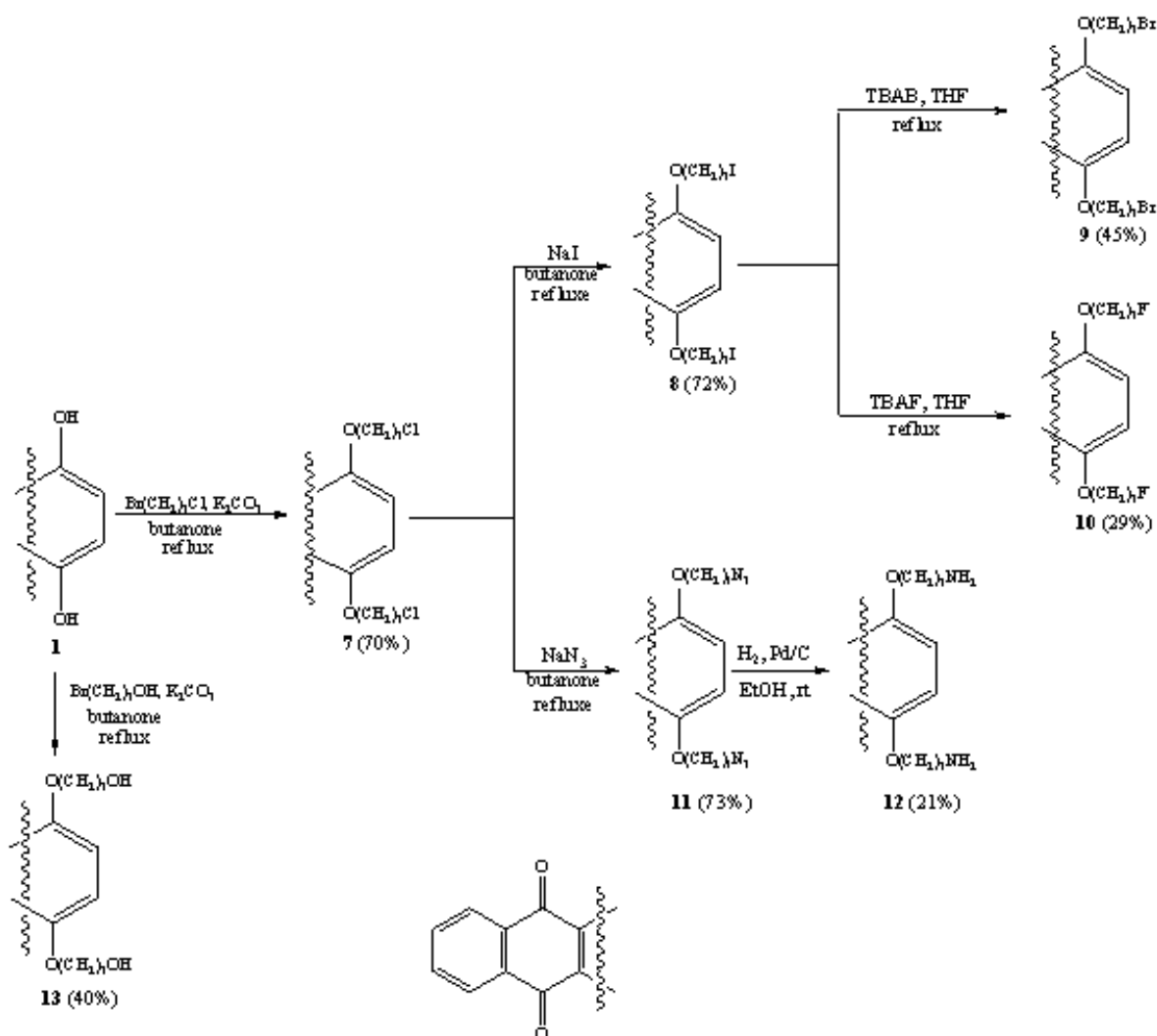


Figura 4 – Esquema de síntese dos derivados antraquinônicos 7-13.

3.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS ANÁLOGOS DA MITOXANTRONA EM MACRÓFAGOS ESTIMULADOS COM LPS E IFN- γ

3.2.1 LINHAGEM CELULAR E CULTURA

Macrófagos J774.A1 mantidos a 37 °C em estufa de CO₂ (5%) em RPMI-1640 suplementado (2 mM de L-glutamina, 100 μ g/mL de estreptomicina e penicilina, 5% de soro fetal bovino) foram utilizados para o estudo. Macrófagos primários de camundongos foram adquiridos pela injeção intraperitoneal (i.p.) de 2,0 ml de tioglicolato (3%) (Sigma Chemical Co., Saint Louis, USA). Após três dias, os camundongos foram sacrificados, a cavidade peritoneal lavada com 5 ml de salina tamponada gelada contendo 0,1% de soro albumina bovina e 20 μ mol/L de EDTA e o exsudato foi coletado e contado. A viabilidade celular de ambos os grupos celulares foi avaliada pelo método de exclusão por azul de trypan 0,4%.

As células foram distribuídas (2×10^5 cell/mL) em placas de 96 poços em RPMI-1640 suplementado e mantidas a 37 °C em 5% de CO₂. Os macrófagos foram cultivados por 48 horas na presença ou ausência da mitoxantrona ou dos derivados nas concentrações de 0,2, 1, 5 e 25 μ g/mL e estimulados ou não com LPS (1 μ g/mL) e IFN- γ (0.9 ng/mL) em quintuplicata. Como controle foram utilizados células apenas estimuladas com LPS e IFN- γ e não tratadas com os análogos, células não estimuladas e células não estimuladas tratadas com DMSO 0,1% (dilúente utilizado na dissolução da mitoxantrona e dos análogos).

3.2.2 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA MITOXANTRONA E SEUS ANÁLOGOS

A viabilidade dos macrófagos J774.A1 foi determinada pelo método colorimétrico do MTT (corante *Thiazol Blue Tetrazolium Bromido* - Sigma, St. Louis, MO, USA). Para o teste, após o tempo de cultura de 48 horas os sobrenadantes foram coletados para posterior dosagem de NO e a seguir foram adicionados nos poços contendo as células cultivadas 100 μ L de RPMI e 10 μ L de MTT (5mg/mL). A placa foi incubada a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Transcorrido o período de 4 horas a reação foi finalizada com o acréscimo de 100 μ L de álcool isopropílico acidificado com 0,4% de HCL 1N. A absorbância foi lida a 570 nm e a citotoxicidade (%) obtida pela fórmula $100 - ((\bar{x}_1 / \bar{x}_2) * 100)$, considerando \bar{x}_1 e \bar{x}_2 a media da

OD (570nm) nos poços de células tratadas com os derivados e células não tratadas, respectivamente.

3.2.3 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE NO

A concentração de NO (indiretamente determinada pela dosagem de nitrito) foi medida pelo método de Griess, no sobrenadante de 48 horas de cultura. Para realização do teste 100 µL de sobrenadante de cada poço foram transferidos para placas de 96 poços, posteriormente foi acrescentado igual volume de reagente de Griess (1% de sulfanilamida, 0,1% de *N*-(1-naftil)-etileno diamina hidrocloreto, 5% H₃PO₄, Sigma, St. Louis, MO, USA). A concentração de NO foi determinada por comparação com uma solução padrão de nitrito de sódio. A absorvância medida a 540 nm. O *N*^G-monometil-*L*-arginina (L-NMMA) foi utilizado como padrão positivo do controle da inibição. A porcentagem de inibição foi calculada em relação à inibição do L-NMMA e células apenas estimuladas.

3.3 AVALIAÇÃO DO DERIVADO CS56 NO MODELO IN VIVO DE EAE

3.3.1 ANIMAIS

Foram utilizados 40 camundongos da linhagem C57Bl/6, fêmeas, com 6-8 semanas, provenientes do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da UFJF. Eles foram mantidos na sala de manutenção de animais do laboratório de Imunologia, em estantes ventiladas e dieta *ad libitum*. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios do Código Brasileiro para a Utilização de Animais de Laboratório. Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais da UFJF (Protocolo número 006/2008)

3.3.2 INDUÇÃO DA EAE

Cada animal foi imunizado por via subcutânea (s.c.) em cada lado da região dorsal próxima à base da cauda com 100 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ (Sigma Chemical Co, Saint Louis, USA) emulsionado em Adjuvante Completo de Freund (Sigma) na proporção de 1:1 suplementado com 400 µg de *Mycobacterium tuberculosis* (H37 RA; Difco Detroit, USA). No dia da imunização e após 48 horas, cada animal recebeu i.p. 300 ng de toxina pertussis (Sigma) em PBS em cada aplicação.

3.3.3 TRATAMENTO COM MITOXANTRONA E ANÁLOGO

Os camundongos foram divididos em 4 grupos: (a) EAE (induzido e não-tratado); (b) EAE tratado (induzido e tratado com mitoxantrona); (c) EAE tratado (induzido e tratado com o análogo CS56); (d) controle (não-induzido e não-tratado).

O tratamento foi iniciado no 14º dia após a indução da EAE através de injeções intraperitoneais e se estendeu até o 21º dia após a indução, considerando-se o dia da indução como dia 0. A mitoxantrona e seus análogos foram diluídos em PBS com 1% de DMSO na concentração inicial de 5mg/mL. As injeções i.p. foram feitas na concentração de 1mg/kg em 100µl, adaptada de Piao e colaboradores (2007).

3.3.4 AVALIAÇÃO CLÍNICA

Os camundongos foram pesados diariamente desde o dia da indução (dia 0) até o dia da eutanásia (21º dia após imunização). Os animais também foram avaliados com relação a incapacidade neurológica através da escala apresentada na tabela 1, conforme adaptada por De Paula e colaboradores (2008).

Tabela 1 - Escala de incapacidade neurológica

<i>Cauda:</i>	
0 ^a	Um camundongo normal mantém sua cauda ereta enquanto se move.
1	Se a extremidade da cauda está flácida, com tendência a cair.
2	Se a cauda está completamente flácida e arrasta na superfície.
<i>Membros inferiores:</i>	
0	Um camundongo normal tem uma marcha enérgica e não arrasta suas patas.
1	Um dos dois testes seguintes é positivo: -Teste da virada: enquanto mantém a cauda entre o polegar e o indicador, vire o animal de barriga para cima e observe o tempo que ele leva para acertar a postura. Um camundongo saudável se vira imediatamente. Uma demora sugere fraqueza nas patas traseiras; -Posicione o camundongo na parte externa da gaiola e observe sua movimentação à medida que ele atravessa de uma extremidade à outra da gaiola. Se uma ou ambas as patas traseiras freqüentemente atravessam as barras da gaiola, consideramos que há uma paralisia parcial.
2	Ambos os testes anteriores são positivos.
3	Uma ou ambas as patas traseiras mostram sinais de paralisia, mas algum movimento é preservado, por exemplo: o animal pode agarrar e se manter na parte interna da gaiola por um curto momento antes de se soltar.
4	Quando ambas as patas traseiras estão paralisadas e o camundongo as arrasta enquanto se move.
<i>Patras dianteiras:</i>	
0	Um camundongo normal usa suas patas dianteiras ativamente para se agarrar e andar e mantém sua cabeça ereta.
1	Andar é possível, mas difícil, devido à fraqueza em uma ou ambas as patas; por exemplo, as patas dianteiras são consideradas fracas quando o camundongo tem dificuldade em se agarrar na parte interior da gaiola. Outro sinal de fraqueza é falta de tônus no pescoço.
2	Quando uma pata dianteira está paralisada (impossibilidade de agarrar) e o camundongo fica dando voltas em torno da pata paralisada. Nesse momento, o pescoço também já perdeu muito de seu tônus muscular.
3	O camundongo não pode se mover e não consegue beber água ou se alimentar.
<i>Bexiga:</i>	
0	Um camundongo normal tem total controle sobre sua bexiga.
1	Um camundongo é considerado incontinente quando a porção posterior de seu corpo está encharcada de urina.
<i>Morte:</i>	
15	

^a Pontuação numérica estabelecida arbitrariamente

3.3.5 OBTENÇÃO DE PLASMA, ÓRGÃOS E CÉLULAS

Após 21 dias da indução de EAE, os camundongos foram eutanasiados por dose letal de Xilazina (10 mg/Kg) e Ketamina (150 mg/Kg). Foi coletado o sangue (punção cardíaca) para a obtenção de plasma, a medula espinhal e o cérebro, para dosagem de citocinas, anticorpos e quimiocinas, avaliação do perfil celular e análise histopatológica.

3.3.6 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

No 21º dia após a indução da EAE os animais foram sacrificados e cérebro e medula foram fixados por perfusão em formalina tamponada (PBS 10%). Cortes transversais de cérebro, transversais da medula em níveis cervical, torácico e lombar, foram processados para inclusão em parafina. Cortes de 8 µm foram corados em H&E para avaliar a presença de infiltrados inflamatórios e corados com luxol *fast blue* para avaliar a desmielinização.

Os cortes foram examinados e documentados em microscópio olympus BX51 através de uma câmera e software para aquisição digital das imagens.

3.3.7 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS POR ELISA

Para a avaliação dos níveis de citocinas e quimiocinas, porções dos órgãos congelados a -80° C foram descongelados e o cérebro e a medula espinhal foram macerados em tampão de extração de citocinas (100mg/mL) composto de: 0,4 M de NaCl (Isofar Indústria e Comércio), 0,05% de tween 20 (Isofar Indústria e Comércio), 0,5% de soro-albumina bovina - BSA (Sigma), 0,1 M de fluoreto de fenil-metil-sulfonil - PMSF (Sigma), 0,1 M de cloreto de benzetônio - BC (Sigma), 10 mM de ácido etileno diamino tetracético - EDTA (Sigma) e 20 pM de aprotinina - AP (Sigma). Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados a 10.000 rpm por 15 minutos a 4° C e os sobrenadantes foram coletados e congelados a -70 °C. As concentrações de IL-17, IFN- γ , IL-12p40, IL-6, IL-10, TGF- β , CCL20 e CCL5 nos sobrenadantes foram determinadas pelo método ELISA utilizando anticorpos e concentrações comercialmente disponíveis de acordo com os procedimentos recomendados pelo fabricante para IFN- γ , IL-12p40, IL-6, IL-10, TGF- β , CCL20 e CCL5 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, EUA) e para IL-17 (eBioscience, San Diego, USA).

3.3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram representados pela média \pm erro-padrão. As variáveis numéricas foram avaliadas nos diferentes grupos pelo teste de normalidade de Kolgomorov-Smirnov para distribuição gaussiana dos dados. Foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney para determinação das diferenças significantes entre os grupos de camundongos, com nível de significância menor que 5% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS ANÁLOGOS DA MITOXANTRONA NA VIABILIDADE CELULAR E PRODUÇÃO DE NO EM MACRÓFAGOS ESTIMULADOS COM LPS E IFN- γ

Os resultados obtidos nos experimentos *in vitro*, são representativos de três experimentos independentes. A verificação dos efeitos dos derivados na viabilidade celular foi determinada pelo método colorimétrico de MTT após cultivo dos macrófagos por 48 horas. Os resultados apresentados na tabela 2 mostram que os compostos testados, em sua maioria, não foram citotóxicos nas concentrações inferiores a 5 $\mu\text{g/mL}$, na linhagem de macrófagos J774A.1. Já para os macrófagos peritoneais (Tabela 3), excluindo-se o análogo CS56, todos os outros foram tóxicos para as concentrações superiores a 1 $\mu\text{g/mL}$. A mitoxantrona, por sua vez, foi tóxica em todas as concentrações testadas em ambos os macrófagos (Tabela 2 e 3).

A avaliação do efeito dos derivados na liberação de NO por macrófagos estimulados com LPS e IFN- γ , mostra que o composto CS56 foi capaz de inibir a produção de NO pelos macrófagos J774.A1 em níveis muito próximos ao observado pelo padrão de inibição – LNMMA - (Tabela 2). Entretanto, quando avaliado a capacidade de inibição da liberação de NO nos macrófagos peritoneais, somente o composto CS56 levou a uma pequena inibição, sem ser citotóxico (Tabela 3).

Tabela 2. Inibição da produção de Óxido Nítrico e viabilidade celular pelos derivados antraquinônicos análogos da mitoxantrona em macrófagos J774A.1 estimulados com LPS/IFN- γ .

Compostos	Inibição de NO ^a				Viabilidade celular			
	0,2 ^b	1	5	25	0,2	1	5	25
(07)CS 42	22%	24%	29%	94% ^{cit}	100%	100%	100%	86% ^c
(08)CS 56	35%	36%	71%	158% ^{cit}	100%	100%	100%	43% ^c
(09)CS 62	0%	0%	0%	16% ^{cit}	100%	100%	94%	71% ^c
(10)CS 60	0%	0%	0%	0%	98%	96%	90% ^c	87% ^c
(11)CS 46	25%	28%	33%	58% ^{cit}	100%	100%	100%	72% ^c
(12)CS 48d	0%	0%	0%	0%	100%	100%	100%	86% ^c
(13)CS 59	0%	0%	0%	0%	100%	100%	100%	79% ^c
Mitoxantrona	16% ^{cit}	62% ^{cit}	123% ^{cit}	141% ^{cit}	72% ^c	30% ^c	22% ^c	19% ^c
LNMMMA	100%				100%			

^a A porcentagem de inibição foi calculada em relação a inibição obtida pelo LNMMMA e as células estimuladas não tratadas. Os resultados foram calculados usando a fórmula $100 - ((\bar{X}_1 - A) / (\bar{X}_2 - A)) * 100$, considerando \bar{X}_1 e \bar{X}_2 a média da concentração de NO (μM) nos poços contendo os derivados e as células estimuladas não tratadas, respectivamente. “A” corresponde a concentração de NO no sobrenadantes dos poços tratados com LNMMMA.

^b Concentração das drogas ($\mu\text{g/mL}$).

^c Citotóxico.

^{cit} Inibição relacionada com a citotoxicidade.

Tabela 3. Inibição da produção de Óxido Nítrico e viabilidade celular pelos derivados antraquinônicos análogos da mitoxantrona em macrófagos peritoneais estimulados com LPS/IFN- γ .

Compostos	Inibição de NO ^a				Viabilidade celular			
	0,2 ^b	1	5	25	0,2	1	5	25
(07)CS 42	8%	14% ^{cit}	22% ^{cit}	119% ^{cit}	96%	80% ^c	76% ^c	68% ^c
(08)CS 56	14%	16%	26%	106% ^{cit}	100%	100%	97%	60% ^c
(09)CS 62	0%	0%	0%	35% ^{cit}	100%	90% ^c	85% ^c	61% ^c
(10)CS 60	0%	0%	0%	25% ^{cit}	90% ^c	83% ^c	75% ^c	59% ^c
(11)CS 46	13%	14% ^{cit}	17% ^{cit}	32% ^{cit}	100%	83% ^c	80% ^c	62% ^c
(12)CS 48d	0%	0%	0%	0%	98%	90% ^c	85% ^c	78% ^c
(13)CS 59	0%	0%	0%	0%	95%	93%	90% ^c	87% ^c
Mitoxantrona	93% ^{cit}	139% ^{cit}	145% ^{cit}	147% ^{cit}	80% ^c	47% ^c	36% ^c	33% ^c
LNMMMA	100%				100%			

^a A porcentagem de inibição foi calculada em relação a inibição obtida pelo LNMMMA e as células estimuladas não tratadas. Os resultados foram calculados usando a fórmula $100 - ((\bar{X}_1 - A) / (\bar{X}_2 - A)) * 100$, considerando \bar{X}_1 e \bar{X}_2 a média da concentração de NO (μM) nos poços contendo os derivados e as células estimuladas não tratadas, respectivamente. “A” corresponde a concentração de NO no sobrenadantes dos poços tratados com LNMMMA.

^b Concentração das drogas ($\mu\text{g/ml}$).

^c Citotóxico.

^{cit} Inibição relacionada com a citotoxicidade.

4.2 AVALIAÇÃO DO CURSO CLÍNICO DA EAE

Após a etapa de estudos *in vitro*, o análogo CS56 foi escolhido por ter sido o composto que combinava duas importantes características, a capacidade de inibir a produção de NO sem provocar citotoxicidade dos macrófagos.

Nesta fase do experimento foi determinado o curso clínico da EAE nos animais tratados com o análogo CS56. A evolução do quadro clínico da EAE é determinada através dos pontos atribuídos aos sinais clínicos apresentados na tabela 1, além da alteração no peso dos camundongos. Os resultados obtidos do escore clínico dos animais demonstraram que no grupo EAE houve a detecção do escore clínico no 11º dia após a indução da EAE, o qual foi progredindo até o pico no 19º dia após a indução e mantendo elevadamente estáveis após este dia (sinal clínico médio de 4 pontos) (Figura 5 A). Já nos grupos tratados com MIT e CS56, o pico ocorreu no 16º após a indução do modelo e a partir deste ponto houve uma tendência de diminuição dos sinais clínicos da EAE e estes dados são significativamente diferentes do grupo EAE (EAE induzidos e não tratados) a partir do 17º dia após a indução para CS56 ($p < 0,05$) (Figura 5 A).

Para os níveis médios dos pesos dos camundongos dos grupos EAE, MIT e CS21 não foi observada diferença entre os grupos (Figura 5 B).

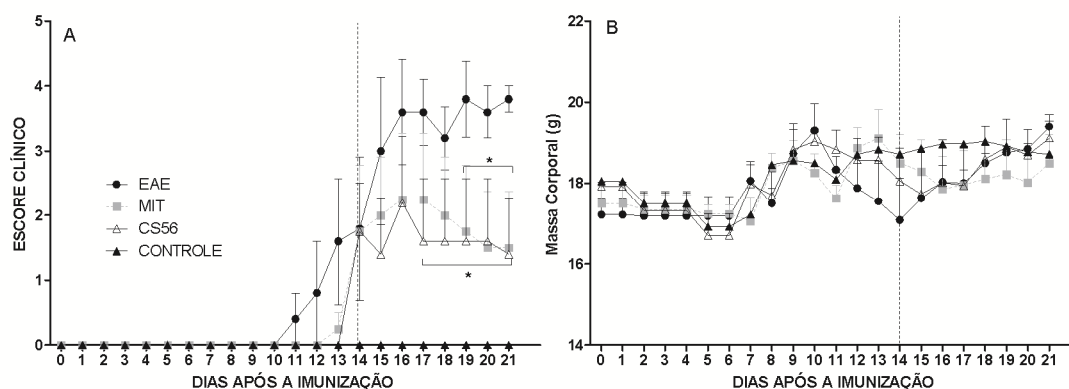


Figura 5 - Sinais clínicos da EAE. Os animais foram monitorados diariamente para os sinais clínicos da EAE após imunização com 100 µg de peptídeo MOG₃₅₋₅₅. Os camundongos foram tratados (n = 5) ou não (n = 5) com 1mg/kg de Mitoxantrona ou CS56 durante 7 dias. (A) Escore clínico dos camundongos tratados e não-tratados com MIT ou CS56. (B) Medidas de peso dos camundongos induzidos tratados e não-tratados. Cada ponto representa a média aritmética ± SEM. *, p<0,05 quando comparados os animais tratados (MIT e CS56) aos animais não tratados (EAE). A linha pontilhada indica o dia do início do tratamento.

4.3 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DA MEDULA ESPINHAL

Para a avaliação do infiltrado celular na medula espinhal (Figura 6) foram feitos cortes os quais foram corados com H&E, para avaliação do infiltrado celular, ou LFB, para determinação do grau de desmielinização, para os grupos controle, EAE, MIT e CS56. Pode-se observar um aumento do infiltrado celular nos tecidos dos animais com EAE e uma relativa redução do infiltrado após o tratamento com MIT e CS56. Além do aumento do infiltrado celular uma maior extensão da desmielinização foi observada nos animais com EAE que apresentou-se reduzida após o tratamento (Figura 6).

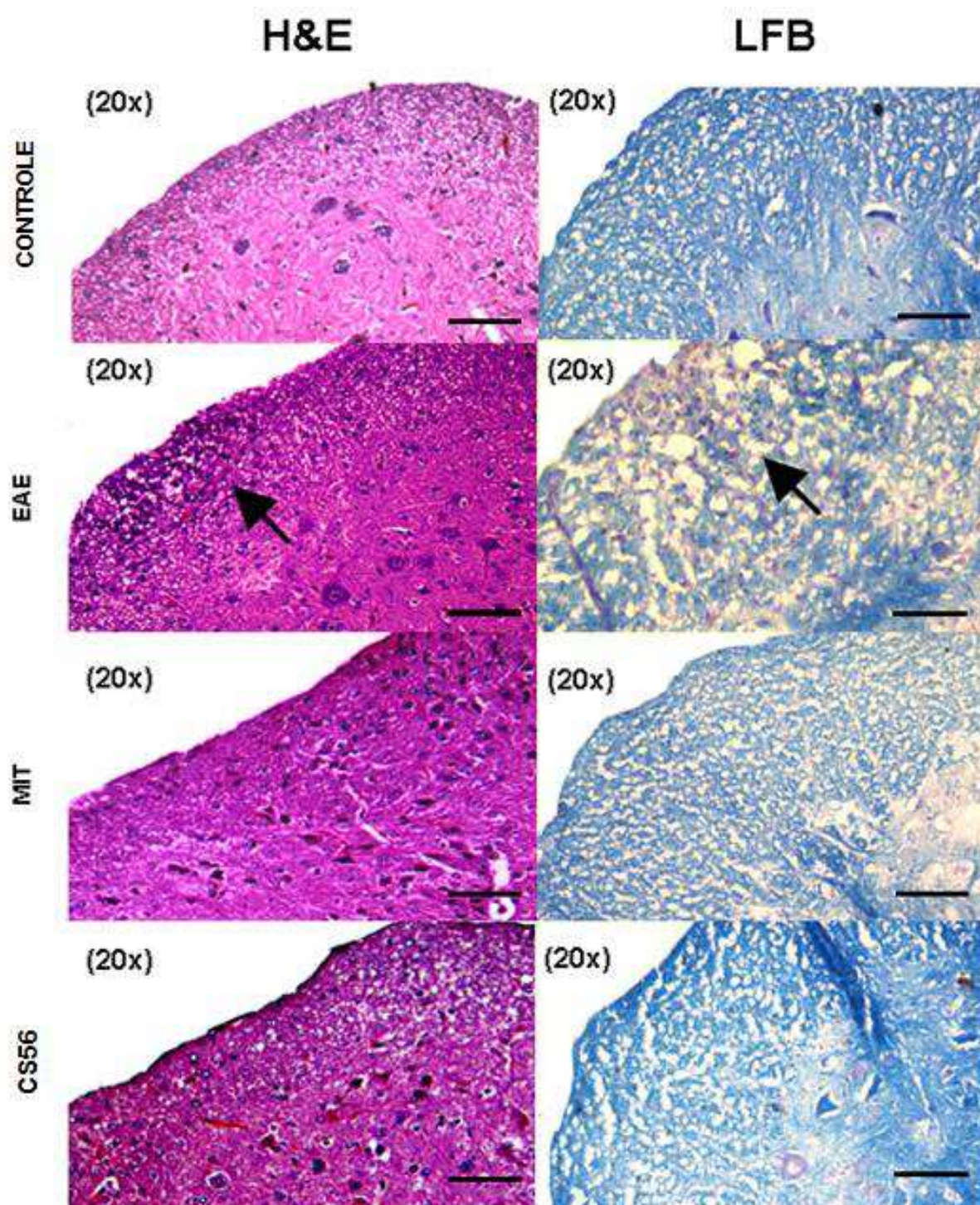


Figura 6 – Histopatologia da medula dos camundongos imunizados ou não com 100 µg de peptídeo MOG₃₅₋₅₅. Os camundongos foram tratados (n = 5) ou não (n = 5) com 1mg/kg de Mitoxantrona ou CS56 durante 7 dias. Cortes representativos dos grupos examinados, corados com hematoxilina e eosina (H&E), para análise do infiltrado de células, ou luxol *fast blue* (LFB), para análise da desmielinização. Aumento Original: objetiva de 20X. Setas indicam os infiltrados celulares. Barra 50 µm.

4.4 AVALIAÇÃO DE CITOCINAS NA MEDULA

Os presentes resultados mostram que o tratamento com CS56 reduziu os níveis de IL-17, IFN- γ , IL-6, IL-12p40 e TGF- β (Figura 7). Já o tratamento com MIT não foi capaz de reduzir os níveis de IFN- γ , IL-6 e TGF- β (Figura 7 B, C e E) em relação ao grupo EAE ($p < 0,05$).

Os animais EAE apresentaram aumento dos níveis de IL-17, IFN- γ , IL-6 e IL-12p40 (Figura 7 A - D) e, em relação a TGF- β , esta manteve-se inalterada, quando comparados ao grupo controle (Figura 7 E).

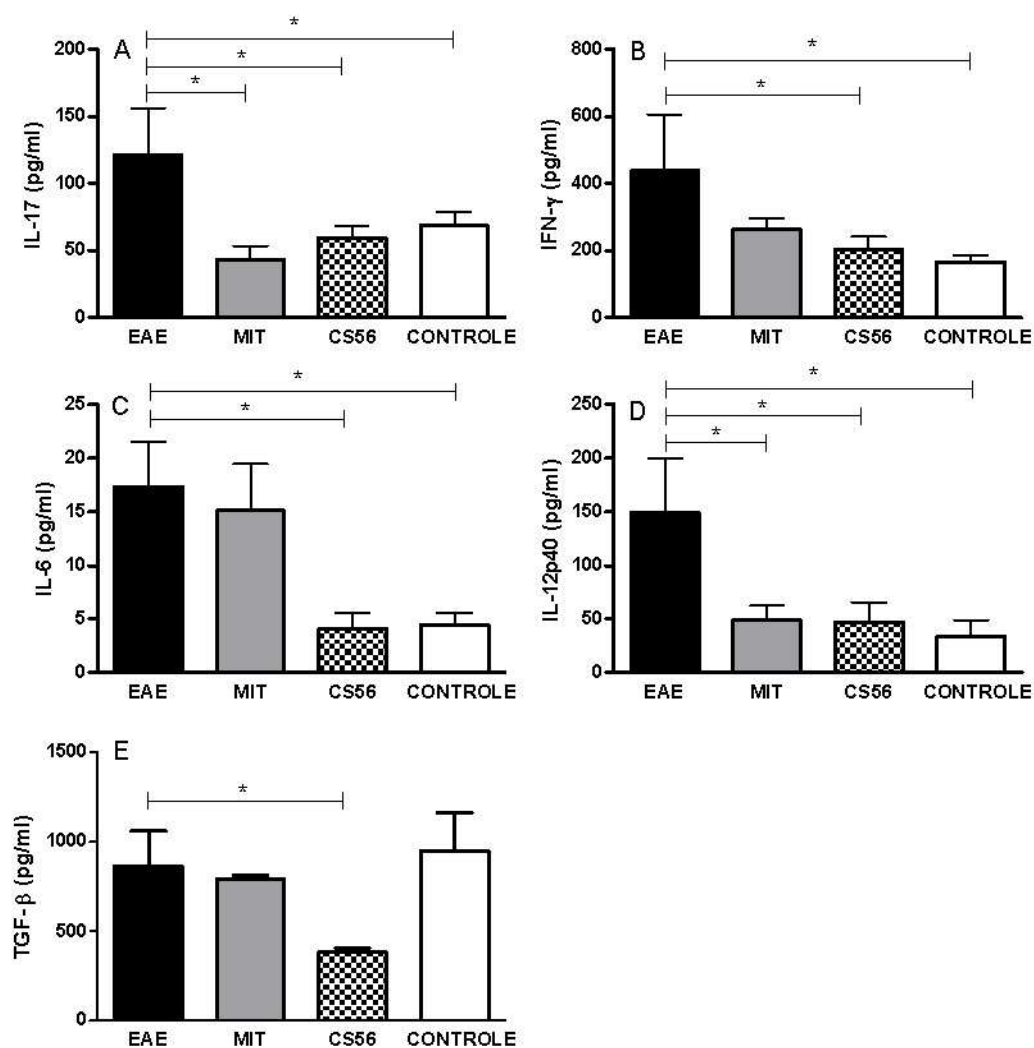


Figura 7 – Avaliação das citocinas IL-17 (A), IFN- γ (B), IL-6 (C), IL-12p40 (D) e TGF- β (E) na medula. Níveis de citocinas no sobrenadante do macerado de medula de camundongos imunizados com 100 μ g de peptídeo MOG₃₅₋₅₅ e tratados (n = 5) ou não-tratados (n = 5) com 1mg/kg de MIT ou CS56 e grupo controle (n = 5) no 21º dia pós-imunização. Cada barra representa a média aritmética \pm SEM. * p<0,05 quando comparados ao grupo EAE.

4.5 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE QUIMIOCINAS NA MEDULA

A dosagem de CCL5 e CCL20 foi feita nos sobrenadantes do macerado de medula espinhal dos animais e pode-se observar que o tratamento com o análogo CS56 reduziu os níveis destas quimiocinas nas amostras, enquanto o tratamento com MIT não alterou a produção das mesmas em relação ao grupo EAE (Figura 8). Os animais EAE apresentaram níveis aumentados de ambas as quimiocinas em comparação ao grupo controle (Figura 8)

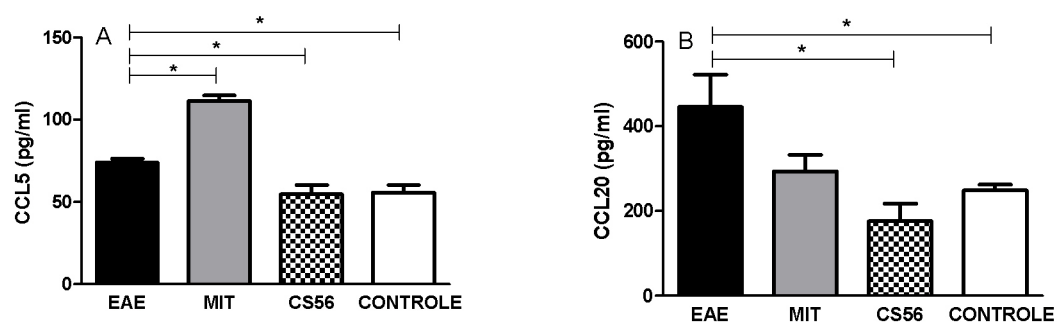


Figura 8– Detecção de quimiocina. Produção de CCL5 (A) e CCL20 (B) no sobrenadante do macerado do medula de camundongos imunizados com 100 µg de peptídeo MOG₃₅₋₅₅ e tratados (n = 5) ou não-tratados (n = 5) com 1mg/kg de mitoxantrona ou CS56 no 21º dia pós-imunização. Cada barra representa a média aritmética ± SEM. * p<0,05 quando comparados ao grupo EAE.

5 DISCUSSÃO

A EM é uma doença crônica, inflamatória e desmielinizante do SNC com uma etiologia ainda pouco conhecida (CEPOK et al., 2005). Os tratamentos para a EM disponíveis atualmente possuem uma série de desvantagens como, por exemplo, serem parcialmente efetivos, não serem eficazes na contenção da progressão da doença, exigirem injeções regulares, além do alto custo (revisto por PLATTEN; STEINMAN, 2006). O presente estudo investiga os efeitos do tratamento com *O,O'*-di-(3'-iodopropil)-1,4-dihidroxi-antraquinona (CS56), derivado antraquinônico análogo da mitoxantrona, na modulação da resposta imune utilizando o modelo murino de EAE. Os resultados obtidos mostraram um potencial efeito terapêutico do CS56 na melhora dos sinais clínicos da EAE.

Neste estudo inicialmente foi avaliado o efeito dos derivados antraquinônicos na viabilidade celular e na produção de NO por macrófagos ativados com LPS e IFN- γ . Os resultados mostraram que o CS56 foi capaz de inibir a liberação de NO causando pouca ou nenhuma citotoxicidade aos macrófagos, principalmente na dosagem de 5 μ g/ml. Diversos estudos, já demonstraram a relevância do NO, nitritos e nitratos, além da NO sintase em processos inflamatórios e na exacerbação dos mesmos (NAVA; PALMER; MONCADA, 1991; KUBES; SUZUKI; GRANGER, 1991; MULLIGAN et al., 1991; LEVINE, PUNIHAAOLE; LEVINE, 2012; REYES, 2012). A EM, por ser uma doença inflamatória crônica (CEPOK et al., 2005), já algum tempo vem despertando o interesse de pesquisadores para o papel do óxido nítrico e derivados na patogênese da doença. Estudos mostram que o NO está envolvido na exacerbação da inflamação no CNS e na desmielinização dos axônios, e que a inibição do mesmo, leva a uma melhora dos sinais clínicos do modelo experimental (PARKINSON, MITROVIC; MERRILL, 1997; POZZA et al., 2000; ENCINAS, MANGANAS; ENIKOLOPOV, 2005; ZENG et al., 2012; LJUBISAVLJEVIC(a) et al., 2012; LJUBISAVLJEVIC(b) et al., 2012). Com isso, pelo resultado de inibição da liberação do NO, o CS56 foi escolhido como potencial composto de teste para a melhora da EAE.

Os resultados do presente estudo mostram que o CS56 foi capaz de melhorar o escore clínico da EAE. Esta melhora pode ser correlacionada com os baixos níveis de CCL5, CCL20, IL-17, IFN- γ , IL-12p40, IL-6 e TGF- β na medulla espinhal condizendo com redução do infiltrado inflamatório e da desmielinização.

A migração de leucócitos para o SNC é sabidamente orquestrada por quimiocinas produzidas pelas células endoteliais, astrócitos e micróglia (HESSELGESSER; HORUK, 1999). Previamente foi demonstrado que o bloqueio de CCR6, o receptor para a quimiocina CCL20, é capaz de inibir o desenvolvimento da EAE através da redução da quimiotaxia de

células T CD4+ autorreativas (LISTON et al., 2009; VILLARES et al., 2009). Além disso, a regulação do CCL5, ou do seu receptor CCR5, modula o recrutamento de leucócitos e consequentemente, a patogênese da EAE (DOS SANTOS et al., 2008; YANG et al., 2012). Com isso, os níveis reduzidos de CCL5 e CCL20 na medula espinhal dos camundongos no presente estudo, podem ser relacionados com a redução no recrutamento de células T CD4+ produtoras de IFN- γ e IL-17, sugerindo a melhora no sinal clínico da EAE nos camundongos tratados com CS56.

A desmielinização na EAE, assim como na EM, é resultado das lesões provocadas pelo processo inflamatório na substância branca, levando ao prejuízo dos sintomas clínicos (TRAPP et al., 1999; CLARNER et al., 2012; LEVY-BARAZANY; FRENKEL, 2012). Lublin e colaboradores (1987) e em seguida, Watson e colaboradores (1991) demonstraram a capacidade da mitoxantrona em reduzir a desmielinização nos modelos de EAE. O tratamento com CS56, assim como a mitoxantrona, levou a redução na desmielinização, reduzindo os sinais clínicos nos camundongos induzidos.

As citocinas, principalmente IL-17 e IFN- γ , vem sendo sugeridas com papel importante na indução e na gravidade da EAE e da EM (KOMIYAMA et al., 2006; STEINMAN, 2007; PAREEK et al., 2011; CASIRAGHI et al., 2012). O'Connor e colaboradores (2008) demonstraram que células Th1 produtoras de IFN- γ são capazes de entrar no SNC não inflamado e criar processo inflamatório no local, algo que as células Th17 não são capazes e só migrariam para o SNC após o processo inflamatório estabelecido pelas células Th1, exacerbando o mesmo. Já Kebir e colaboradores (2007) demonstraram que os linfócitos Th17 humanos são capazes de penetrar a barreira hemato-encefálica pela produção de IL-17, e ao adentrar no SNC liberam fatores capazes de causar a morte dos neurônios e promover a inflamação no local. Em revisão desenvolvida por Pierson e colaboradores (2012), os mesmos afirmam que os reais mecanismos de regulação da entrada de linfócitos Th1 e/ou Th17 no SNC e da patogênese causada pelos mesmos ainda não estão completamente esclarecidos, mas que existe um padrão de aparecimento de células IFN- γ + e IL-17+ na medula, determinando o modelo clássico de EAE, enquanto um predomínio de IL-17+ no cérebro dos camundongos determina um modelo atípico da EAE. O tratamento com CS56 levou a uma redução tanto de IFN- γ quanto de IL-17 na medula dos camundongos EAE, correlacionando-se a melhora nos sinais clínicos.

A citocina IL-6 é conhecida por estar envolvida na patogênese do SNC durante a EAE, tanto por diretamente provocar a ativação da microglia e dos astrócitos (FERRARI et

al., 2004) quanto por indiretamente promover com TGF- β a diferenciação de células Th0 para Th17 (VELDHOEN et al., 2006). Roy e colaboradores (2012) demonstraram que a IL-6 induz aumento da expressão de quimiocinas relacionadas a quimiotaxia e adesão de granulócitos para os vasos sanguíneos do SNC levando ao agravamento dos sinais clínicos da EAE. Além disso, O'Connor e colaboradores (2012) mostraram que a redução da sinalização desencadeada pela IL-6, através do bloqueio dos seus receptores, nas células Treg, impede que estas se tornem células produtoras de IL-17 no SNC inflamado durante a EAE. Diferentes estudos já demonstraram a capacidade de derivados antraquinônicos reduzirem a produção e liberação de IL-6 em diferentes modelos de inflamação (KUO et al., 2001; HA et al., 2011; LU et al., 2011; LU et al., 2012). No presente estudo, o tratamento com CS56 reduziu não só a IL-6, como também o TGF- β , correlacionando com a redução de IL-17 na medula dos camundongos.

A interleucina-12, devido sua relação com as células Th1, é considerada de relativa importância na patogênese da EM e da EAE (SMITH et al., 1997; SMITH et al., 2011). Devido as subunidades proteicas da IL-12 (p35 e p40), estudos com camundongos “knockouts” para as subunidades demonstraram que é a subunidade p40, também subunidade da IL-23, é quem estaria relacionada a susceptibilidade e/ou agravamento da EAE (CUA et al., 2003; MURPHY et al., 2003; ZHANG et al., 2003). O tratamento com CS56 levou a uma redução dos níveis de IL-12p40, condizendo também com a redução de IFN- γ , IL17 e melhora dos sinais clínicos dos camundongos.

Desta forma, os resultados obtidos pelo tratamento com *O,O'*-di-(3'-iodopropil)-1,4-dihidroantraquinona sugerem potencial terapêutico deste análogo para a encefalomielite autoimune experimental e conseqüentemente a esclerose múltipla, porém estudos clínicos são necessários para afirmar a eficácia deste composto.

6 CONCLUSÃO

O tratamento com o *O,O'*-di-(3'-iodopropil)-1,4-dihidroxi-antraquinona (CS56), análogo da mitoxantrona, mostrou ser efetivo na melhora dos sinais clínicos da EAE através da redução de CCL5, CCL20, IL-17, IFN- γ , IL-6 e IL-12p40 na medula espinhal dos camundongos, apresentando potencial terapêutico para a EAE, modelo amplamente aceito da Esclerose Múltipla.

7 REFERÊNCIAS

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

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

ARRUDA, W. O. et al. Multiple sclerosis: report on 200 cases from Curitiba, Southern Brazil and comparison with other Brazilian series. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, São Paulo, v. 59, p. 165-170, 2001.

AXTELL, R. C. et al. T helper type 1 and 17 cells determine efficacy of interferon- β in multiple sclerosis and experimental encephalomyelitis. *Nature*, London, v. 16, p. 406-413, 2010.

BARASCH, D. et al. Novel anthraquinone derivatives with redox-active functional groups capable of producing free radicals by metabolism: are free radicals essential for cytotoxicity?. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Amsterdam, v. 34, p. 579-615, 1999.

BIELEKOVA, B. et al. Regulatory CD56bright natural killer cells mediate immunomodulatory effects of IL-2R α -targeted therapy (daclizumab) in multiple sclerosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, Washington, v. 103, p. 5941-5946, 2006.

BOSTER, A. Efficacy, safety, and cost-effectiveness of glatiramer acetate in the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis. **Therapeutic advances in neurological disorders**, London, v. 4, p. 319-332, 2011.

BRETTSCHNEIDER, J. et al. IgG antibodies against measles, rubella, and varicella zoster virus predict conversion to multiple sclerosis in clinically isolated syndrome. **PLoS One**, San Francisco, v. 4, p. e7638, 2009.

BURGER, D. et al. Glatiramer acetate increases IL-1 receptor antagonist but decreases T cell-induced IL-1 β in human monocytes and multiple sclerosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, Washington, v. 106, p. 4355-4359, 2009.

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

CASIRAGHI, C. et al. Gammaherpesvirus Latency Accentuates EAE Pathogenesis: Relevance to Epstein-Barr Virus and Multiple Sclerosis. **PLoS Pathology**, San Francisco, v. 8, p. 1002715, 2012.

CEPOK, S. et al. Identification of Epstein-Barr virus proteins as putative targets of the immune response in multiple sclerosis. **The Journal of Clinical Investigation**, Michigan, v. 115, p. 1352-1360, 2005.

CHIAO E.; MEYER K., Cost effectiveness and budget impact of natalizumab in patients with relapsing multiple sclerosis. **Current Medical Research and Opinion**, New York, v. 25, p. 1445-1454, 2009.

CLARNER, T. et al. Myelin debris regulates inflammatory responses in an experimental demyelination animal model and multiple sclerosis lesions. **Glia**, Malden, 2012 doi: 10.1002/glia.22367. [Epub ahead of print]

CUA, D. J. et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. **Nature**, New York, v. 421, p. 744-748, 2003.

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

DOS SANTOS, A. C. et al. CCL2 and CCL5 mediate leukocyte adhesion in experimental autoimmune encephalomyelitis--an intravital microscopy study. **Journal of Neuroimmunology**, Columbus, v. 162, p. 122-129, 2005.

DOS SANTOS, A. C. et al. Kinin B2 receptor regulates chemokines CCL2 and CCL5 expression and modulates leukocyte recruitment and pathology in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in mice. **Journal of Neuroinflammation**, London, v. 5, p. 49, 2008.

DYMENT, D. A.; EBERS, G. C.; SADOVNICK, A. D. Genetics of multiple sclerosis. **The Lancet neurology**, Philadelphia, v. 3, p. 104-110, 2004.

ELICES, M. J. et al. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. **Cell**, Amsterdam, v. 60, p. 577- 584, 1990.

ENCINAS, J. M.; MANGANAS, L.; ENIKOLOPOV, G. Nitric oxide and multiple sclerosis. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, New York, v. 5, p. 232-238, 2005.

ERCOLINI, A. M.; MILLER, S. D. Mechanisms of immunopathology in murine models of central nervous system demyelinating disease. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 176, p. 3293-3298, 2006.

FERRARI, C. C. et al. Reversible demyelination, blood-brain barrier breakdown, and pronounced neutrophil recruitment induced by chronic IL-1 expression in the brain. **The American Journal of Pathology**, Philadelphia, v. 165, p. 1827-1837, 2004.

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

FOX, E. J. Mechanism of action of mitoxantrone. **Neurology**, Minneapolis v. 63, p. S15-S18, 2004.

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

GOVERMAN, J. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. **Nature Review Immunology**, New York, v. 9, p. 393-407, 2009.

GRIGORIADIS, N.; HADJIGEORGIOU, G. H. Virus-mediated autoimmunity in multiple sclerosis. **Journal of Autoimmune Diseases**, London, v. 3, p. 1, 2006.

GUO, B.; CHANG, E.Y.; CHENG, G. The type I IFN induction pathway constrains Th17-mediated autoimmune inflammation in mice. **The Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor, v. 118, p. 1680-1690, 2008.

HA, M. K. et al. Emodin inhibits proinflammatory responses and inactivates histone deacetylase 1 in hypoxic rheumatoid synoviocytes. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 34, p. 1432-1437, 2011.

HAFNER, A. D. Multiple sclerosis. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 113, p. 788-794, 2004.

HESSELGESSER, J.; HORUK, R. Chemokine and chemokine receptor expression in the central nervous system. **Journal of Neurovirology**, New York, v. 5, p. 13-26, 1999.

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

KANG, Z. et al. Astrocyte-Restricted Ablation of Interleukin-17-Induced Act1-Mediated Signaling Ameliorates Autoimmune Encephalomyelitis. **Immunity**, Cambridge, v. 32, p. 414-425, 2010.

KEBIR, H. et al. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. **Nature Medicine**, New York, v. 13, p. 1173-1175, 2007.

KIM, H. J. et al. Type 2 Monocyte and Microglia Differentiation Mediated by Glatiramer Acetate Therapy in Patients with Multiple . **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 172, p. 7144-7153, 2004.

KOMIYAMA, Y. et al. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 177, p. 566-573, 2006.

KROENKE, M. A. et al. IL-12 and IL-23-modulated T cells induce distinct types of EAE based on histology, CNS chemokine profile, and response to cytokine inhibition. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 205, p. 1535-1541, 2008.

KUBES, P.; SUZUKI, M.; GRANGER, D. N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, Washington, v. 88, p. 4651-4655, 1991.

KUO, Y. C. et al. Immune responses in human mesangial cells regulated by emodin from *Polygonum hypoleucum* ohwi. **Life Sciences**, Amsterdam, v. 68, p. 1271-1286, 2001.

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

LEES, J. R. et al. Regional CNS responses to IFN- γ determine lesion localization patterns during EAE pathogenesis. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 205, p. 2633-2642, 2008.

LEVINE, A. B.; PUNIHAOLE, D.; LEVINE, T. B. Characterization of the Role of Nitric Oxide and Its Clinical Applications. **Cardiology**, Amsterdam, v. 122, p. 55-68, 2012.

LEVY-BARAZANY, H.; FRENKEL, D. Expression of Scavenger receptor A on antigen presenting cells is important for CD4. **Journal of Neuroinflammation**, London, v. 9, p. 120, 2012. [Epub ahead of print]

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

LISTON, A. et al. Inhibition of CCR6 function reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis via effects on the priming phase of the immune response. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 182, p. 3121-3130, 2009.

LJUBISAVLJEVIC, S. et al. Correlation of nitric oxide levels in the cerebellum and spinal cord of experimental autoimmune encephalomyelitis rats with clinical symptoms. **Acta Neurobiologiae Experimentalis (Wars)**, Poland, v. 72, p. 33-39, 2012a.

LJUBISAVLJEVIC, S. et al. Modulation of nitric oxide synthase by arginase and methylated arginines during the acute phase of experimental multiple sclerosis. **Journal of the Neurological Sciences**, Amsterdam, v. 318, p. 106-111, 2012b.

LUBLIN, F. D. et al. Suppression of acute and relapsing experimental allergic encephalomyelitis with mitoxantrone. **Clinical Immunology and Immunopathology**, Orlando, v. 45, p. 122-128, 1987.

LUBLIN, F. D. The incomplete nature of multiple sclerosis relapse resolution. **Journal of the Neurological Sciences**, Amsterdam, v. 256, p. 14-18, 2007.

LU, Y. et al. Emodin, a naturally occurring anthraquinone derivative, suppresses IgE-mediated anaphylactic reaction and mast cell activation. **Biochemical Pharmacology**, Hoboken, v. 182, p. 1700-1708, 2011.

LU, Y. et al. Citreorosein Inhibits Production of Proinflammatory Cytokines by Blocking Mitogen Activated Protein Kinases, Nuclear Factor- κ B and Activator Protein-1 Activation in Mouse Bone Marrow-Derived Mast Cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 35, p. 938-945, 2012.

- MARCONDES, M. C. et al. Immune Regulatory Mechanisms Influence Early Pathology in Spinal Cord Injury and in Spontaneous Autoimmune Encephalomyelitis. **The American Journal of Pathology**, New York, v. 166, p. 1749-1760, 2005.
- MARKAR, T. K. et al. Stem cell based delivery of IFN β reduces relapses in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal Neuroimmunology**, Columbus, v. 196, p. 67-81, 2008.
- MARTIN-SAAVEDRA, F. M. et al. Beta interferon restricts the inflammatory potential of CD4⁺ cells through the boost of the Th2 phenotype, the inhibition of Th17 response and the prevalence of naturally occurring T regulatory cells. **Molecular Immunology**, Oxford, v. 45, p. 4008-4019, 2008.
- MORRISSEY, S. P.; LE PAGE, E.; EDAN, G. Mitoxantrone in the treatment of multiple sclerosis. **The International Multiple Sclerosis Journal**, Worthing, v. 12, p. 74-87, 2005.
- MULLIGAN, M. S. et al. Tissue injury caused by deposition of immune complexes is L-arginine dependent. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, Washington, v. 88, p. 6338-6342, 1991.
- MURPHY, A. C. et al. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 198, p. 1951-1957, 2003.
- MURPHY, A. C. et al. Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Brain, Behavior, and Immunity**, San Diego, v. 24, p. 641-651, 2010.
- NAVA, E.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Inhibition of nitric oxide synthesis in septic shock: how much is beneficial? **Lancet**, Philadelphia, v. 338, p. 1555-1557, 1991.
- NEUHAUS, O.; ARCHELOS, J. J.; HARTUNG, H. P. Immunomodulation in multiple sclerosis: from immunosuppression to neuroprotection. **TRENDS in Pharmacological Sciences**, Amsterdam, v. 24, p. 131-138, 2003.
- NEUHAUS, O.; KIESEIER, B. C.; HARTUNG, H. P. Mechanisms of mitoxantrone in multiple sclerosis: what is known? **Journal of the Neurological Sciences**, Amsterdam, v. 223, p. 25-27, 2004.
- O'CONNOR, R. A. et al. Cutting edge: Th1 cells facilitate the entry of Th17 cells to the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 181, p. 3750-3754, 2008.
- O'CONNOR, R. A. et al. Foxp3⁺ Treg cells in the inflamed CNS are insensitive to IL-6-driven IL-17 production. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 42, p. 1174-1179, 2012.
- O'DAY, K. et al. Cost-effectiveness of natalizumab versus fingolimod for the treatment of relapsing multiple sclerosis. **Journal of medical economics**, London, v. 14, p. 617-627, 2011.

- PAREEK, T. K. et al. Triterpenoid modulation of IL-17 and Nrf-2 expression ameliorates neuroinflammation and promotes remyelination in autoimmune encephalomyelitis. **Scientific Reports**, London, v. 1, p. 201, 2011.
- PARKINSON, J. F.; MITROVIC, B.; MERRILL, J. E. The role of nitric oxide in multiple sclerosis. **Journal of Molecular Medicine (Berlin)**, Berlin, v. 75, p. 174-186, 1997.
- PELFREY, C. M. et al. Immunological studies of mitoxantrone in primary progressive MS. **Journal of Neuroimmunology**, Columbus, v. 175, p. 192-199, 2006.
- PERICOT, I.; MONTALBAN, X. Mitoxantrona. **Neurología**, Barcelona, v. 18, p. 318-323, 2003.
- PIAO, W. H. et al. Therapeutic effect of anthracene-based anticancer agent ethonafide in an animal model of multiple sclerosis. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 179, p. 7415-7423, 2007.
- PIERSON, E. et al. Mechanisms regulating regional localization of inflammation during CNS autoimmunity. **Immunological Reviews**, Copenhagen, v. 248, p. 205-215, 2012.
- PLATTEN, M.; HO, P. P.; STEINMAN, L. Anti-inflammatory strategies for the treatment of multiple sclerosis – tryptophan catabolites may hold the key. **Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies**, Amsterdam, v. 33, p. 401-408, 2006.
- POZZA, M. et al. Further evidence for a role of nitric oxide in experimental allergic encephalomyelitis: aminoguanidine treatment modifies its clinical evolution. **Brain Research**, Amsterdam, v. 855, p. 39-46, 2000.
- QUINTANA, F. J.; WEINER, H. L. Environmental control of Th17 differentiation. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 39, p. 655-657, 2009.
- RANSOHOFF, R. M.; KIVISAKK, P.; KIDD, G. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. **Nature reviews. Immunology**, London, v. 3, p. 569-581, 2003.
- REYES, T.M. Signal in the NOise: The role of nitric oxide in inflammation anorexia. **Brain, Behavior, and Immunity**, Orlando, 2012, doi:10.1016/j.bbi.2012.05.013 [Epub ahead of print]
- ROY, M. et al. CXCL1 can be regulated by IL-6 and promotes granulocyte adhesion to brain capillaries during bacterial toxin exposure and encephalomyelitis. **Journal of Neuroinflammation**, London, v. 9, p. 18, 2012.
- SAWICKA, E. et al. The sphingosine 1-phosphate receptor agonist FTY720 differentially affects the sequestration of CD4⁺/CD25⁺ T-regulatory cells and enhances their functional activity. **The Journal of Immunology**, Bethesda, v. 175, p. 7973-7980, 2005.
- SCOTT, L. J.; FIGGITT, D. P. Mitoxantrone: a review of its use in multiple sclerosis. **CNS Drugs**, Mairangi Bay, v. 18, p. 379-396, 2004.

SMITH, T. et al. Interleukin-12 induces relapse in experimental allergic encephalomyelitis in the Lewis rat. **The American Journal of Pathology**, New York, v. 150, p. 1909-1917, 1997.

SMITH, A. J. et al. Comparison of a classical Th1 bacteria versus a Th17 bacteria as adjuvant in the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Neuroimmunology**, Columbus, v. 237, p. 33-38, 2011.

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

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

STEINMAN, L. A brief history of TH17, the first major revision in the TH1/TH2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. **Nature Medicine**, London, v. 13, p. 139–145, 2007.

HART, B. A.; AMOR, S. The use of animal models to investigate the pathogenesis of neuroinflammatory disorders of the central nervous system. **Current Opinion in Neurology**, Minneapolis, v. 16, p. 375-383, 2003.

TILBERY, C. P. Attention Impairment Associated With Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis Patients with Mild Incapacity. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, São Paulo, v. 65, p. 262-267, 2007.

TRAPP, B. D. et al. Pathogenesis of tissue injury in MS lesions. **Journal of Neuroimmunology**, Columbus, v. 98, p. 49-56, 1999.

VELDHOEN, M. et al. TGF beta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. **Immunity**, Cambridge, v. 24, p. 179–189, 2006.

VILLARES, R. et al. CCR6 regulates EAE pathogenesis by controlling regulatory CD4+ T-cell recruitment to target tissues. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 39, p. 1671-1681, 2009.

VOLLMER, T. The natural history of relapses in multiple sclerosis. **Journal of the Neurological Sciences**, Amsterdam, v. 256, suppl.5-13, 2007.

WATSON, C. M. et al. Suppression of demyelination by mitoxantrone. **International Journal of Immunopharmacology**, Oxford, v. 13, p. 923-930, 1991.

WENSKY, A. K. et al. IFN- γ Determines Distinct Clinical Outcomes in Autoimmune Encephalomyelitis. **The Journal of Immunology**, Bethesda, v. 174, p. 1416-1423, 2005.

YANG, J. et al. Accelerated and enhanced effect of CCR5-transduced bone marrow neural stem cells on autoimmune encephalomyelitis. **Acta Neuropathologica**, Berlin, 2012. doi: 10.1007/s00401-012-0989-1 [Epub ahead of print]

YEN, J.H.; KONG, W.; GANEA, D. Interferon beta inhibits dendritic cell migration through STAT-1 mediated transcriptional suppression of CCR7 and metalloproteinase 9. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 184, p. 3478-3486, 2010.

YIN, J. X. et al. Centrally administered pertussis toxin inhibits microglia migration to the spinal cord and prevents dissemination of disease in an EAE mouse model. **PLoS One**, San Francisco, v. 5, p. 1-14, 2010.

ZENG, X. et al. Topographical and Biological Evidence Revealed FTY720-Mediated Anergy-Polarization of Mouse Bone Marrow-Derived Dendritic Cells In Vitro. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, p. e34830, 2012.

ZHANG, G. X. et al. Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in IL-12 receptor-beta 2-deficient mice: IL-12 responsiveness is not required in the pathogenesis of inflammatory demyelination in the central nervous system. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 170, p. 2153-2160, 2003.

PARTE II

**AÇÃO DO DERIVADO CS56 NO MODELO DE ALERGIA
PULMONAR**

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 ASMA

A asma é uma doença crônica, na qual as vias aéreas são caracterizadas por inflamação, hiperresponsividade e obstrução intermitente ao fluxo aéreo. Embora a causa precisa seja desconhecida, parece resultar de uma interação entre fatores genéticos e exposição ambiental (BLUMENTHAL, 2012). Manifesta-se clinicamente por episódios recorrentes de sibilância, dispnéia e aperto no peito (MEDEIROS, et al. 2011).

Considerada um grave problema de saúde, estima-se que a asma afete mais de 300 milhões de pessoas em todo o mundo, acarretando cerca de 160 mil hospitalizações por ano no Brasil, acometendo indivíduos de ambos os sexos, de todas as idades, grupos raciais, culturais e níveis econômicos (GINA, 2011; DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA PARA O MANEJO DA ASMA, 2012). A asma severa corresponde por 5% a 10% dos casos, e causa 50% do total de custos a saúde relacionados a asma (THOMSON; CHAUDHURI; SPEARS, 2011). Infecções com o vírus da gripe comum estão entre as causas do aumento da asma severa (KIENINGER et al., 2012).

O encargo econômico imposto pela asma é considerável, incluindo tanto custos diretos, como hospitalizações e serviços médicos, quanto custos indiretos, como perda de dias de escola e trabalho. A asma causa sério impacto na qualidade de vida, restringindo significativamente as atividades do indivíduo (FRANCO et al., 2009, SHENOLIKAR et al., 2011).

1.2. RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA ASMA

A asma é caracterizada por uma resposta de hipersensibilidade imediata, sendo a sequência típica de eventos iniciada com a exposição a um antígeno, por via inalatória (AVERBECK et al., 2007). Essa resposta é predominantemente de células Th2, com altos níveis de IgE total e alérgeno-específica, eosinofilia brônquica, infiltrado de células T CD4+ nas vias aéreas e produção de citocinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) (VIEIRA et al., 2007; CHU et al., 2012). A citocina IL-4 leva a mudança de isotipo para IgE pelos linfócitos B, a IL-5 recruta e ativa eosinófilos e a IL-13 está associada ao desenvolvimento de

hiperresponsividade das vias aéreas e produção de muco pela ativação da mucina 5AC nas células caliciformes (KOCH et al., 2006; SHI; QIN, 2005; YU et al., 2010; KANG; JUNG; KIM, 2012).

A persistência de uma resposta Th2 leva ao remodelamento das vias aéreas, caracterizado por deposição de colágeno e fibras elásticas, hipertrofia e hiperplasia do músculo liso, hipertrofia das glândulas produtoras de muco e aumento da vascularização (VIEIRA et al., 2007).

Nos últimos anos, entretanto, tem sido bem estabelecido que o desequilíbrio do sistema imunológico ocorrido nas respostas alérgicas não pode ser explicado somente pela predominância de uma resposta Th2 em detrimento de uma resposta Th1, havendo participação tanto de células T regulatórias (Treg) quanto de células Th17, nesse processo.

Mais do que isso, as células Th17 tem sido relacionadas ao aumento da severidade da asma (LAJOIE et al., 2010; KUDO et al., 2012; MADDUR et al., 2012; NAKAGOME; MATSUSHITA; NAGATA, 2012). A IL-17 está relacionada com a regulação da resposta inflamatória pulmonar e a defesa pulmonar do hospedeiro (HUNG et al., 2008). Porém, indivíduos com asma severa demonstram não somente um aumento exacerbado da hiperresponsividade bronquica, como também uma elevação do infiltrado de neutrófilos e aumento da produção de IL-17 nos pulmões (BARCZYK; PIERZCHALA; SOZANSKA, 2003; CHAKIR et al., 2003; AL-RAMLÍ et al., 2009). Lajoie e colaboradores (2010) demonstraram que a produção elevada e concomitante de IL-17A e de citocinas das células Th2 levam os camundongos a desenvolver hiperresponsividade brônquica severa. Além disso, o bloqueio da IL-17A reduz a severidade da doença.

Já as células T regulatórias CD4⁺CD25⁺ são componentes importantes da homeostase do sistema imune e a deficiência na sua atividade pode estar relacionada ao desenvolvimento de doenças alérgicas. Os mecanismos pelos quais essas células atuam permanecem controversos, mas estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem papéis relevantes para as citocinas IL-10 e TGF- β e para fatores de transcrição como o FOXP3. Nesse sentido, as células T CD4⁺CD25⁺ atuam normalmente suprimindo respostas Th2 para alérgenos, regulariam a inflamação eosinofílica e limitariam o desenvolvimento do fenótipo de células pró-inflamatórias Th2, principalmente, por limitar a produção de citocinas (SHI; QIN, 2005).

1.3. MODELO MURINO DE ASMA

O uso preditivo de modelos animais é essencial para o entendimento das doenças e subsequente desenvolvimento de novas e efetivas drogas para o seu tratamento (BRAUN; TSCHERING; GRONEBERG, 2008). Os modelos murinos de asma alérgica experimental têm sido utilizados para investigar os mecanismos imunopatológicos que levam ao desenvolvimento dessa doença (FERNANDEZ-RODRIGUEZ et al., 2008).

Vários protocolos para indução de asma alérgica experimental, tanto aguda quanto crônica, tem sido publicados empregando uma ampla variedade de antígenos, rotas de aplicação, doses, sequências e avaliações (BÖRGER et al., 2008, McANULTY, 2011). A maioria dos modelos para a indução de asma em camundongos utiliza uma sensibilização sistêmica com diferentes proteínas, seguido por um período de desafio que consiste na exposição inalatória repetida do antígeno (HOLMES; SOLARI; HOLGATE, 2011).

Em relação à linhagem de camundongos, a mais comumente usada é a BALB/c, pois os camundongos dessa linhagem exibem uma tendência geneticamente determinada para desenvolver uma resposta imune desviada para Th2 (SCHRÖDER; MAURER, 2007). Entre os antígenos empregados, encontra-se o extrato do ácaro (*Dermatophagoides* spp.) de poeira doméstica (HDM), capaz de induzir uma forte resposta Th2, IgE-específica, com elevada produção de muco, infiltração celular e broncorestrição (KAWAKAMI et al., 2012, FREDRIKSSON et al., 2012).

Similarmente aos humanos, os camundongos desenvolvem hiperreatividade das vias aéreas, inflamação peribrônquica com infiltrados consistindo principalmente de linfócitos e eosinófilos, aumento na IgE total, desenvolvimento de anticorpos IgE específicos para o antígeno e hiperplasia das células caliciformes (SCHRÖDER; MAURER, 2007).

1.4. TRATAMENTO DA ASMA

O principal objetivo do tratamento da asma é a obtenção e manutenção do controle da doença, ou seja, o controle dos sintomas e a prevenção das exacerbações, já que não há cura para esta patologia até o momento (DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA PARA O MANEJO DA ASMA, 2012). Nesse sentido, a combinação de corticóides inalatórios com beta-agonistas de ação prolongada caracteriza a terapia mais eficaz disponível atualmente. Alguns efeitos colaterais importantes, como por

exemplo, catarata e osteoporose, podem ser observados quando essas drogas são utilizadas em altas doses e por tempo prolongado (ADCOCK; CARAMORI; CHUNG, 2008).

Nas crises de asma o tratamento deve ser instituído imediatamente para diminuição dos sintomas agudos, sendo os medicamentos de escolha os beta-2 agonistas inalatórios de curta duração, podendo ainda haver a necessidade de uso de corticosteróides orais (GINA, 2011).

A maioria dos asmáticos responde bem aos tratamentos disponíveis atualmente, entretanto, a exacerbação e a severidade da doença são eventos comuns e de difícil controle nos pacientes asmáticos (ADCOCK; CARAMORI; CHUNG, 2008). Nesses casos as opções terapêuticas são reduzidas e os resultados dos tratamentos com drogas alternativas como ciclosporina, brometo de ipratrópio, sulfato de magnésio e aminofilina são variáveis e devem ser avaliados individualmente (DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA PARA O MANEJO DA ASMA, 2012).

Apesar dos diferentes estudos de compostos com relativa eficácia terapêutica na asma, poucos trabalhos mostram o efeito de derivados antraquinônicos em alergias pulmonares (LU et al., 2011; CHU et al., 2012). Estudos com o derivado antraquinônico emodin, mostraram que o tratamento com este composto reduz o infiltrado de eosinófilos e a atividade de mastócitos, além de reduzir a produção de citocinas Th2 em modelos experimentais (LU et al., 2011; CHU et al., 2012).

Existe, portanto, a necessidade de desenvolver novas drogas para tratamento dos pacientes com asma severa e de difícil controle e outras que objetivem a cura da doença.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do *O,O'*-di-(3'-iodopropil)-1,4-dihidroxi-antraquinona (CS56), derivado antraquinônico análogo da mitoxantrona, na modulação da resposta imune no modelo de alergia pulmonar induzida por HDM.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar a evolução da obstrução das vias aéreas na alergia pulmonar (AP), através da hiperresponsividade bronquica;
- ✓ Avaliar o infiltrado celular e produção de muco nos pulmões, através da histopatologia;
- ✓ Avaliar os níveis de expressão gênica de citocinas e fatores de transcrição nas vias aéreas, através de qRT-PCR;
- ✓ Avaliar a produção de citocinas nos linfonodos peribronquiais, através de ELISA;
- ✓ Avaliar a evolução da obstrução das vias aéreas na exacerbação da AP com vírus, através da hiperresponsividade bronquica;
- ✓ Avaliar o infiltrado celular na exacerbação da AP com vírus;
- ✓ Quantificar os números virais na exacerbação da AP com vírus, através de qRT-PCR.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos livre de patógenos da linhagem BALB/c, machos, com 6-8 semanas, provenientes da *University of Newcastle*. Eles foram mantidos na sala de manutenção de animais, em estantes climatizadas e dieta *ad libitum*. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais da *University of Newcastle*.

3.2 INDUÇÃO E EXACERBAÇÃO DA ALERGIA PULMONAR (AP)

Para o estudo da AP, camundongos foram sensibilizados intranasalmente (i.n.) com 50 μ l de extrato de alérgeno de poeira doméstica (house dust mite – HDM – 1 μ g/ μ l) nos dias 0, 1 e 2. Os animais foram então desafiados, nos dias 14, 15, 16 e 17, com 50 μ l de HDM (0,1 μ g/ μ l) i.n.. Camundongos não sensibilizados receberam somente solução salina. 24 horas após o último desafio, os animais foram sacrificados (Figura 9).

Para a exacerbação da AP, 24 horas após o último desafio, os camundongos foram infectados i.n. com 50 μ l de um solução com 1×10^6 virions/ml de vírus do resfriado comum (Rinovirus – RV) ou 50 μ l de vírus inativado por ultra-violeta (UVRV). Os camundongos foram sacrificados 24 horas após a infecção com o vírus (Figura 9).

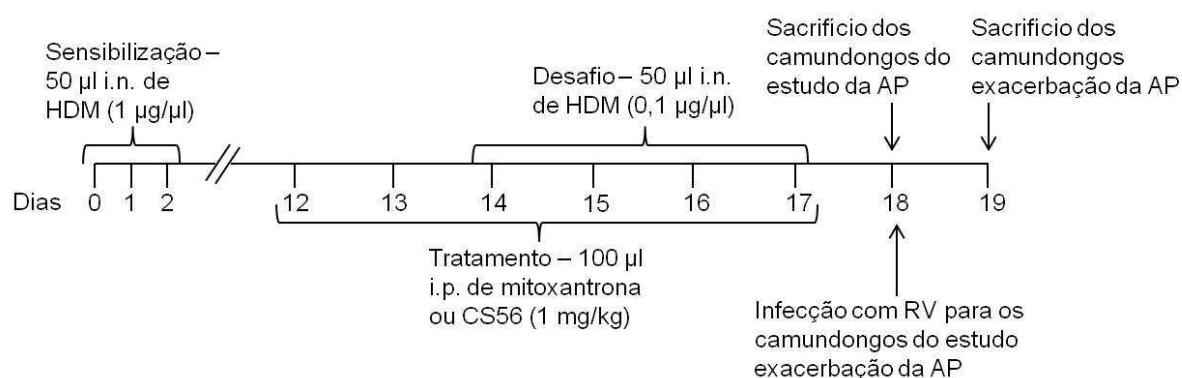


Figura 9. Esquema de indução da alergia pulmonar (AP) e da exacerbação da AP por infecção com vírus da gripe comum (RV).

3.3 TRATAMENTO COM MITOXANTRONA E CS56

Os camundongos do estudo da AP foram divididos em 4 grupos: (a) não-alérgico (Salina); (b) HDM alérgico (HDM); (c) HDM alérgico e tratado com mitoxantrona (MIT); (d) HDM alérgico e tratado com CS56. Para o estudo da exacerbação da AP os camundongos foram divididos em 5 grupos: (a) não-alérgico (Salina); (b) HDM alérgico com infecção do vírus inativado (UVRV); (c) HDM alérgico com infecção do vírus (HDM+RV); (d) HDM alérgico com infecção do vírus e tratado com mitoxantrona (MIT); (e) HDM alérgico com infecção do vírus e tratado com CS56 (CS56).

O tratamento foi iniciado no 12º dia após o início da sensibilização da AP através de injeções intraperitoneais e se estendeu até o 17º dia, considerando-se o dia de início da sensibilização como dia 0. A mitoxantrona e o CS56 foram diluídos em PBS com 1% de DMSO na concentração inicial de 5 mg/mL. As injeções i.p. foram feitas na concentração de 1 mg/kg em 100 µl.

3.4 AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DAS VIAS AÉREAS

A avaliação da resistência das vias aéreas foi feita através da medida da hiperresponsividade brônquica (HRB) dos camundongos no dia do sacrifício (18º ou 19º dia após sensibilização).

Os camundongos foram anestesiados por injeção de 100 µl de pentobarbital (1:30) i.p.. A traqueia foi cirurgicamente exposta, os camundongos foram canulados e submetidos a avaliação da resistência total dos pulmões em resposta a doses crescentes de metacolina através do pleitismógrafo de corpo inteiro (Buxco Electronics Inc. Troy, NY, USA) para análise de resistência e complacência dos pulmões. A resistência foi medida pelo percentual de aumento da resistência em relação à resistência basal (solução salina - PBS).

3.5 OBTENÇÃO DE ÓRGÃOS E CÉLULAS

Vinte e quatro horas após o último desafio ou após a infecção com RV, os camundongos provenientes da análise da AHR foram sacrificados por injeção i.p. letal de pentobarbital (300 µl a 1:30) seguida de exsanguinação. Foi coletado então o lavado

broncoalveolar (LBA), por canulação da traquéia, com agulha (40x12), e instilação de 800 µl de HBSS gelado. A cavidade torácica foi exposta e então os lobos pulmonares foram retirados e armazenados para dosagem posterior de citocinas, avaliação do perfil celular e análise histopatológica.

3.6 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Os pulmões dos camundongos, que não foram submetidos ao LBA, foram fixados por perfusão em formalina tamponada (PBS 10%). Após os procedimentos para inclusão em parafina, cortes de 5 µm foram corados em ácido periódico de Schiff (PAS) – para análise da liberação de muco – ou em azul de toluidina – para análise do infiltrado de mastócitos. Os cortes foram examinados e documentados em microscópio olympus BX51 através de câmera e software para aquisição digital das imagens. A liberação de muco e o infiltrado de mastócitos foram contados em vinte campos com área média de 100 µm² contendo as vias aéreas de maior calibre.

3.7 CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DO LBA

O LBA após coletado foi centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos a 4° C. O sobrenadante foi coletado e armazenado e o precipitado de células foi submetido ao processo de lise de eritrócitos (Tampão de hemólise - Cloreto de amonio – 4,15 g; Bicarbonato de sódio – 1,0 g; EDTA – 0,0185 g; Água Milli Q - 500 mL). Após nova centrifugação o precipitado celular foi suspenso em 100 µl de HBSS. O total de células viáveis foi avaliado por ensaio de exclusão de azul de trypan em câmara de Neubauer. Para a avaliação diferencial das células do LBA, foram feitos citoesfregaços, utilizando a citocentrífuga Cytospin* 4 (Thermo, USA). As lâminas foram então coradas com May-Grunwald-Giemsa. As contagens das células diferenciais foram determinadas de um total de 300 células por esfregaço.

3.8 ANÁLISE QUANTITATIVA DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (QRT-PCR) PARA AVALIAÇÃO DE CITOCINAS E FATORES DE TRANSCRIÇÃO

Lobo do pulmão esquerdo de cada animal foi coletado e as vias aéreas foram separadas e armazenadas em RNA later (Ambion, USA) em -80 °C. RNA total foi extraído de acordo com as instruções do fabricante (mirVana m/miRNA isolation kit, Ambion, USA). Os RNA iniciadores específicos utilizados foram sintetizados pela Sigma (Tabela 4). As reações de qRT-PCR foram feitas usando o SYBR® Green (Kappa Biosystems, USA) de acordo com as especificações do fabricante. RNA foi normalizado com os níveis de *hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase* (HPRT) e a expressão relativa foi calculada com o $2^{-\Delta\Delta C_t}$ método.

Tabela 4. Sequências dos RNA iniciadores específicos utilizados.

Primers	Sequência (5' → 3')	
	Forward	Reverse
IL-17F	CTGTTGATGTTGGACTTGCC	TCACAGTGTATCCTCCAGG
IL-17A	ATCCCTCAAAGCTCAGCGTGTC	GGGTCTTCATTGCGGTGGAGAG
IL-6	TAGTCCTTCTACCCCAATTTCC	TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC
IL-23p19	CCAGCAGCTCTCTCGGAATC	TCATATGTCCCCTGGTGC
IL-10	CATTTGAATTCCTGGGTGAGAAG	GCCTTGTAGACACCTTGGTCTTGG
TGF-β	TGTGGAAGCTTACCAGAAATATAGC	GAAAGCCCTGTATTCCGTCTC
TNF-α	GTCTACTGAACTTCGGGGTGATCG	AGCCTTGTCCCTGAAGAGAACCT
IL-12p35	TACTAGAGAGACTTCTTCCACAACAAGAG	TCTGGTACATCTTCAAGTCCTCATAGA
IFN-γ	CGGCACAGTCATTGAAAGCCTA	GTTGCTGATGGCCTGATTGTC
STAT4	ACTATGGCAACAATTCTGCTTCA	CGCCCCAACTGTTTCATCCAA
STAT3	AATATAGCCGATTCTGCAAGAG	TGGCTTCTCAAGATACTGCTC
Muc5a	TGGGAACCATCATCTACAACCA	TCCTGACTAACCCCTTTGACCA
Foxp3	AGCAGTGTGGACCGTAGATGA	GGCAGGGATTGGAGCACTT
ROR-γT	CGCGGAGCAGACACACTTA	CCCTGGACCTCTGTTTTGGC
Tbet	TGCTTCTAACACACACGTCTTT	TGATCTCTGCGTTCTGGTAGG
RV	GTGAAGAGCCSRTGTGCT	GCTSCAGGGTTAAGGTTAGCC
HPRT	AGGCCAGACTTTGTTGGATTGAA	CAACTGCGCTCATCTTAGGCTTT

3.9 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS NOS LINFONODOS PERIBRONQUIAIS

Linfonodos peribronquiais foram coletados e macerados através de filtros de nylon de 70 μm . Os tubos foram centrifugados, 1500 rpm por 10 minutos a 4° C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado celular foi submetido a lise de eritrócitos (tampão de lise). Após nova centrifugação, o precipitado celular foi suspenso e as células viáveis foram avaliadas por ensaio de exclusão de azul de trypan em câmara de Neubauer. As células foram ajustadas para uma concentração de $1,2 \times 10^6$ células/mL e colocadas em cultura em placas de 96 poços (fundo em U) na presença de HDM (50 $\mu\text{g/mL}$) por 6 dias, em estufa de CO₂ (5%) a 37° C. No sexto dia as placas foram centrifugadas (1500 rpm, 10 minutos 4° C) e o sobrenadante foi coletado para dosagem de IL-5, IL-13 e IFN- γ . Os níveis das citocinas foram determinados por ELISA seguindo as instruções do fabricante (BD Biosciences Pharmingen, USA).

3.10 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MARCADORES EM CÉLULAS PULMONARES E DOS LINFONODOS PERIBRONQUIAIS

Para a avaliação dos perfis celulares nos pulmões e nos linfonodos peribronquiais dos camundongos, ambos os órgãos foram individualmente macerados em 500 μl de RPMI incompleto utilizando-se uma placa de 24 poços. Após a maceração o material foi transferido para tubos falcon de 15 ml e centrifugado por 10 minutos a 1200 rpm a 2°C. Após a lise dos eritrócitos, foi distribuído 30 μl desta solução celular em cada poço de uma placa de 96 poços onde foram acrescentados 10 μl dos marcadores nas seguintes combinações: anti-CD4-PE/anti-CD8-FITC/anti-CD3-PerCP e anti-CD3-PerCP/anti-CD19-FITC (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA.). Após 30 minutos de incubação no gelo e em ambiente escuro foi feita a leitura em aparelho de Citometria de Fluxo (FACSCanto-BD) em ambiente climatizado a 20° C. Os dados foram analisados em *software* específico (FACSDiva – BD). As análises foram feitas através do número absoluto de células expressando os marcadores.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram representados pela média \pm erro-padrão. As variáveis numéricas foram avaliadas nos diferentes grupos pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov

para distribuição gaussiana dos dados. Foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney para determinação das diferenças significantes entre os grupos de camundongos, com nível de significância menor que 5% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DA HIPERRESPONSIVIDADE BRONQUICA (HRB)

Para investigar as propriedades anti-inflamatórias do CS56 e da mitoxantrona, foi induzida a alergia pulmonar (AP) nos camundongos BALB/c. Os camundongos do grupo HDM apresentaram elevada resistência das vias aéreas frente à metacolina (Figura 10). Após o tratamento com CS56 ou mitoxantrona, houve redução na resistência das vias aéreas (Figura 10).

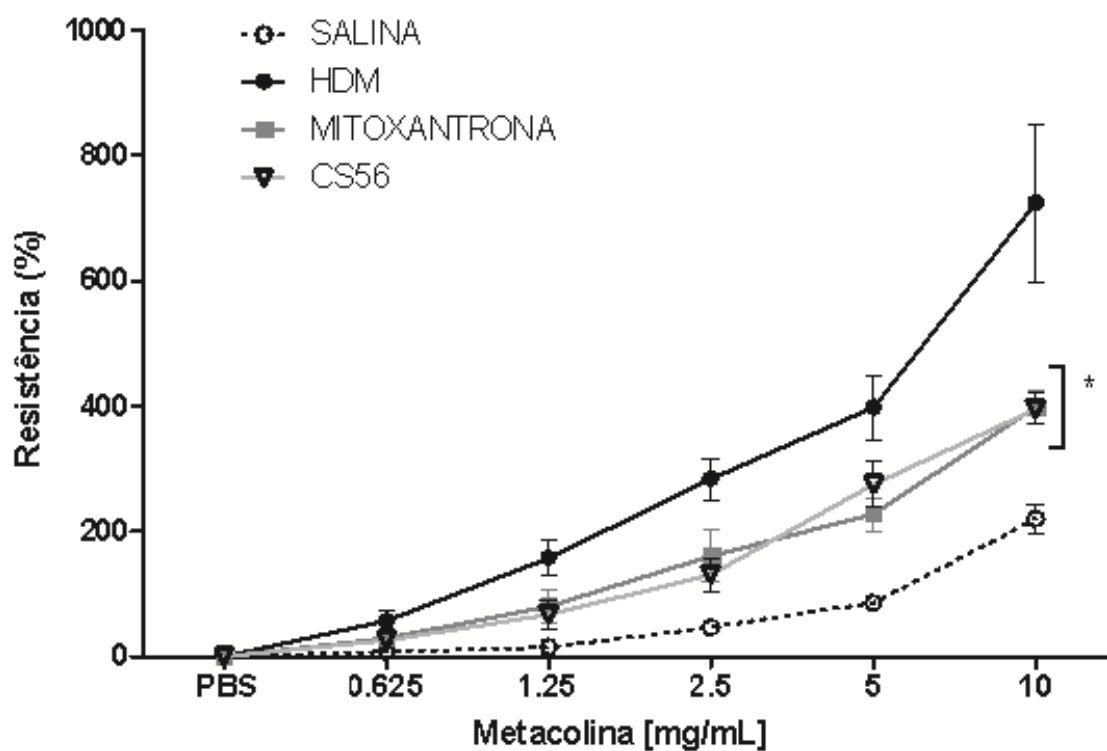


Figura 10 – Hiperresponsividade brônquica (HRB). Os animais foram submetidos à análise da HRB no 18º dia após a sensibilização. Os camundongos foram tratados (n =8) ou não (n = 8) com 1 mg/kg de Mitoxantrona ou CS56 durante 6 dias. Cada ponto representa a média aritmética \pm SEM. *, $p < 0,05$ quando comparados os animais tratados (MIT e CS56) com os animais não tratados (HDM).

4.2 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DO PULMÃO

Para a avaliação histopatológica do pulmão, foram feitos cortes os quais foram corados com PAS ou azul de toluidina, para os grupos salina (A e G), HDM (B e H), MIT (C e I) e CS56 (D e J). Pode-se observar um aumento no número de células produtoras de muco e no infiltrado de mastócitos nos pulmões dos animais alérgicos (Figura 11 B-F e H-K). Após o tratamento observa-se uma redução do número de células caliciformes produzindo muco e do infiltrado de mastócitos (Figura 11 C-F e I-K). Além disso, o tratamento com mitoxantrona ou CS56 reduziu a expressão do RNAm (Muc5a) para produção de muco (Figura 11 F).

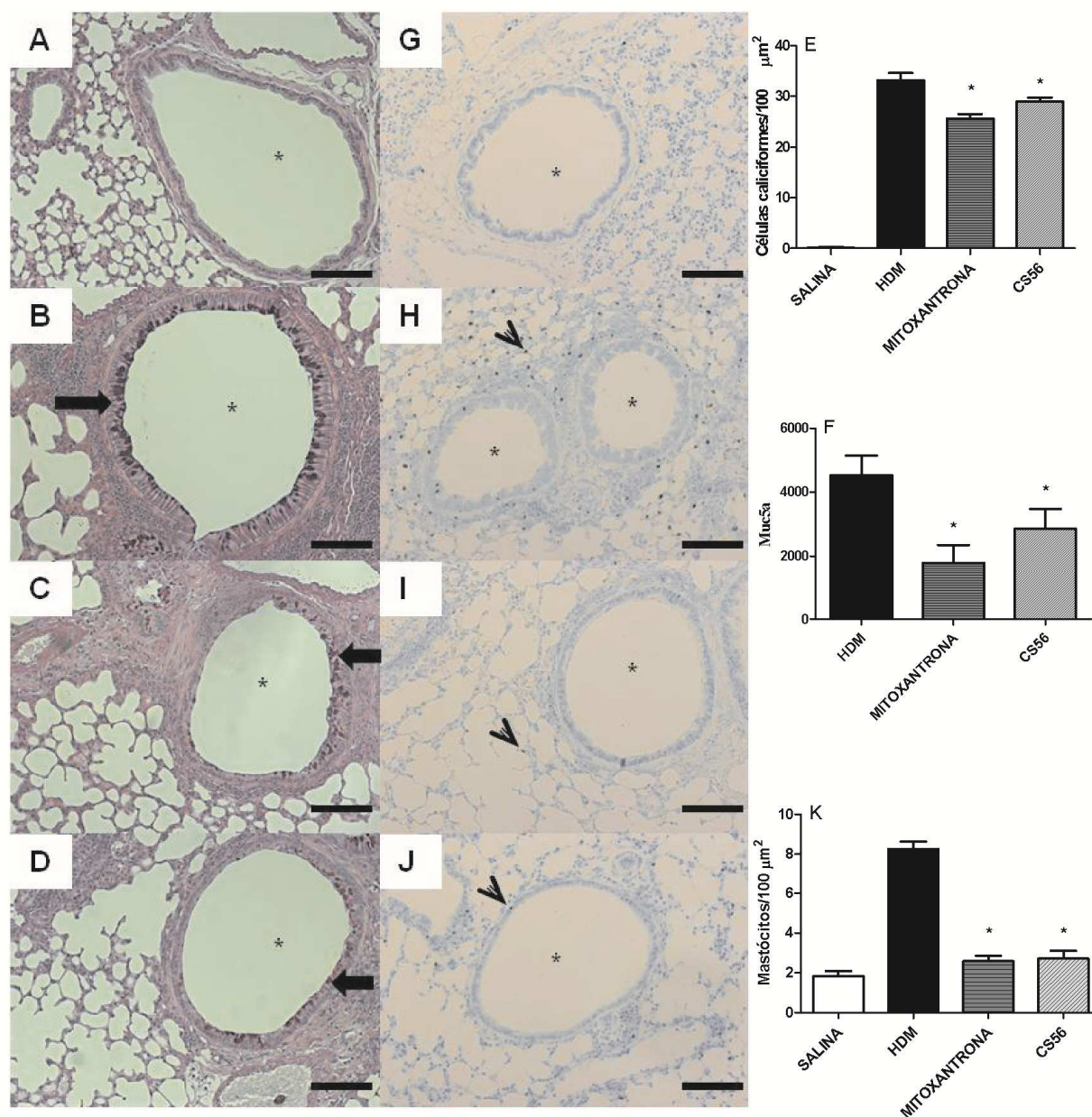


Figura 11 – Histologia do pulmão dos camundongos do grupo salina (A e G), HDM (B e H), mitoxantrona (C e I) e CS56 (D e J). Cortes representativos dos grupos examinados. Aumento original: objetiva de 10X. Setas indicam a produção de muco. Cabeças de setas indicam os mastócitos. * lúmen brônquico. Barra 50 μm . Contagem média das células caliciformes (E) e dos mastócitos (K) em 100 μm^2 . * $p < 0,05$ quando comparados ao HDM. (F) Expressão relativa ao grupo salina de RNAm para mucina nas vias aéreas. * $p < 0,05$ quando comparados ao HDM.

4.3 AVALIAÇÃO DA CONTAGEM CELULAR NO LAVADO BRONCOALVEOLAR (LBA)

Para avaliar as possíveis alterações nos números celulares nos diferentes grupos experimentais, o LBA foi coletado e submetido a contagem por azul de trypan e May-Grunwald-Giemsa. A indução da AP elevou o número total de células (Figura 12A) por conseguinte o número de neutrófilos, linfócitos e, principalmente, eosinófilos (Figura 12B). O tratamento com mitoxantrona ou CS56 reduziu o número total de células e os números de neutrófilos, linfócitos e eosinófilos presentes no LBA (Figura 12A e B).

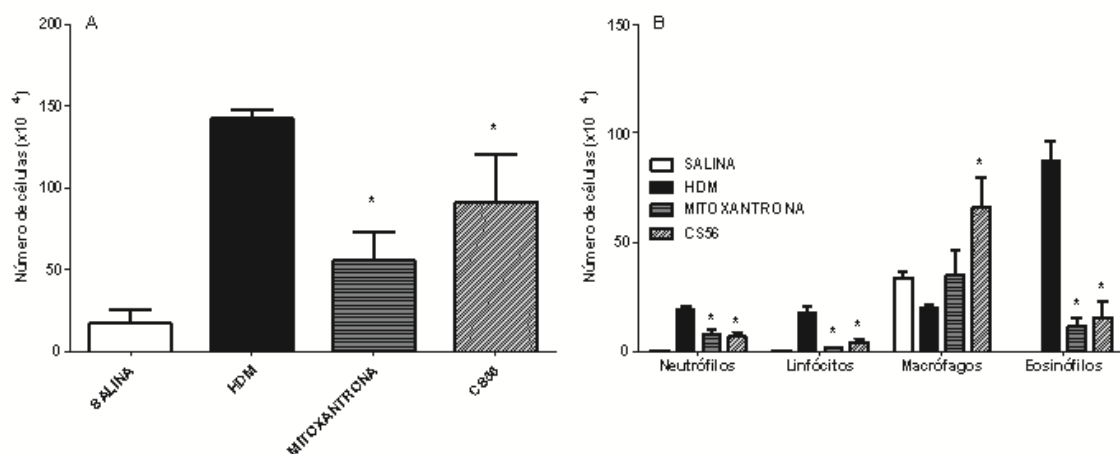


Figura 12 – Contagem de células no BAL. Contagem total (A) e diferencial (B) de células no BAL de camundongos HDM tratados ($n = 8$) ou não-tratados ($n = 8$) com 1mg/kg de MIT ou CS56 e do grupo salina ($n = 8$) no 18º dia. Cada barra representa a média aritmética \pm SEM. * $p < 0,05$ quando comparados ao grupo HDM.

4.4 EXPRESSÃO DE RNAm POR qRT-PCR

Para avaliar as possíveis alterações na expressão de RNAm para os diferentes perfis de células T auxiliares, as vias aéreas foram submetidas a análise por qRT-PCR. O tratamento com CS56 reduziu a expressão de RNAm relacionados ao perfil de Th1 como STAT4, Tbet e TNF- α (Figura 13). Mais do que isso, o CS56 reduziu os principais parâmetros relacionados ao perfil Th17 – STAT3, ROR- γ T, IL-17A, IL-17F, IL-23 e IL-6 (Figura 14). Além disso, o tratamento foi capaz de aumentar a expressão de RNAm para T reguladoras – FOXP3, IL-10 e TGF- β (Figura 15). O tratamento com mitoxantrona reduziu a expressão de todos os marcadores analisados, excluindo-se FOXP3, IL-10, IL-12p35 e IFN- γ (Figura 13 e 15).

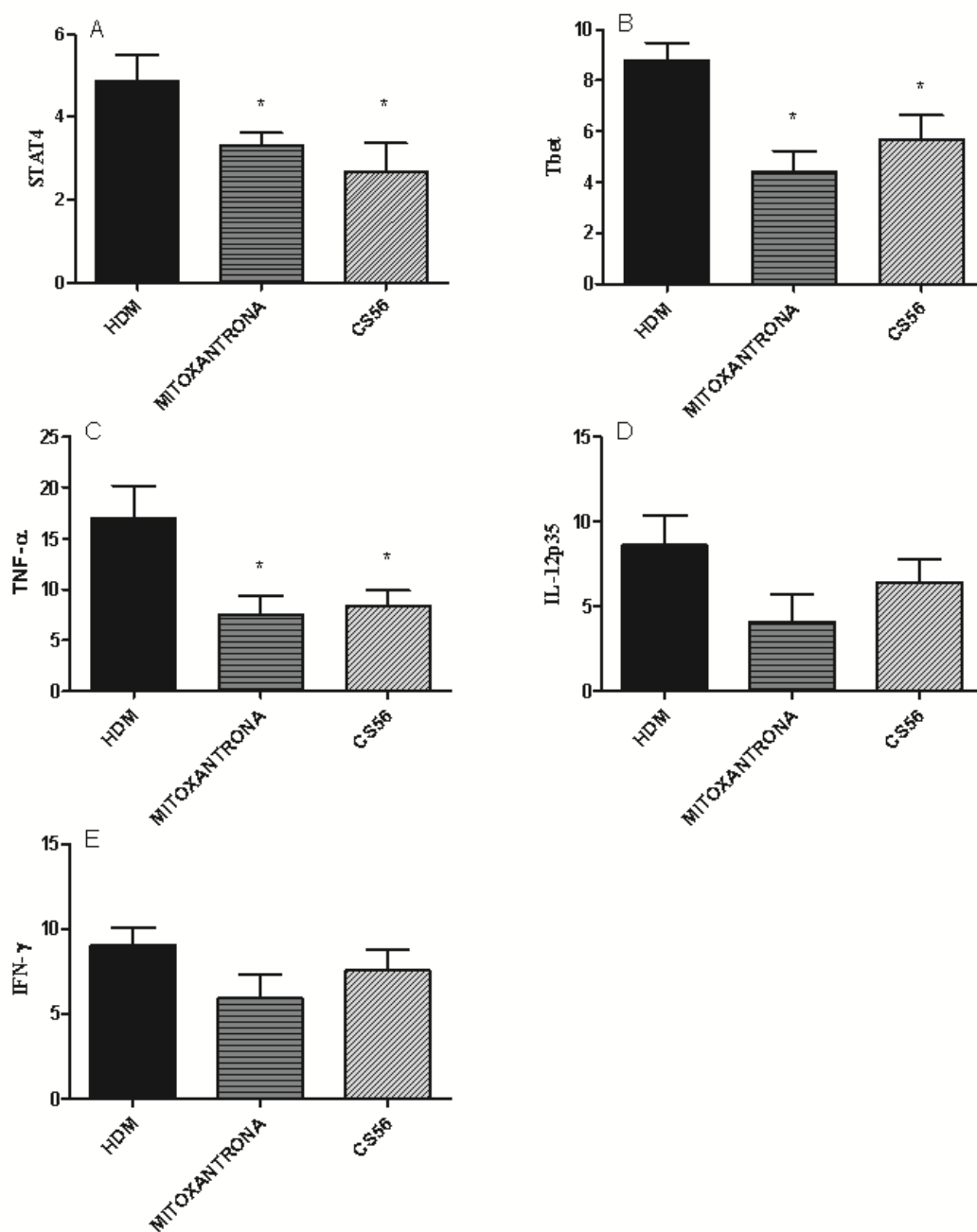


Figura 13 – Expressão de RNAm relacionados ao perfil Th1. Expressão relativa à salina de STAT4, Tbet, TNF- α , IL-12p35 e IFN- γ nas vias aéreas de camundongos AP induzidos e tratados (n = 8) ou não-tratados (n = 8) com 1mg/kg de MIT ou CS56. Cada barra representa a média aritmética \pm SEM. * p<0,05 quando comparados ao grupo HDM.

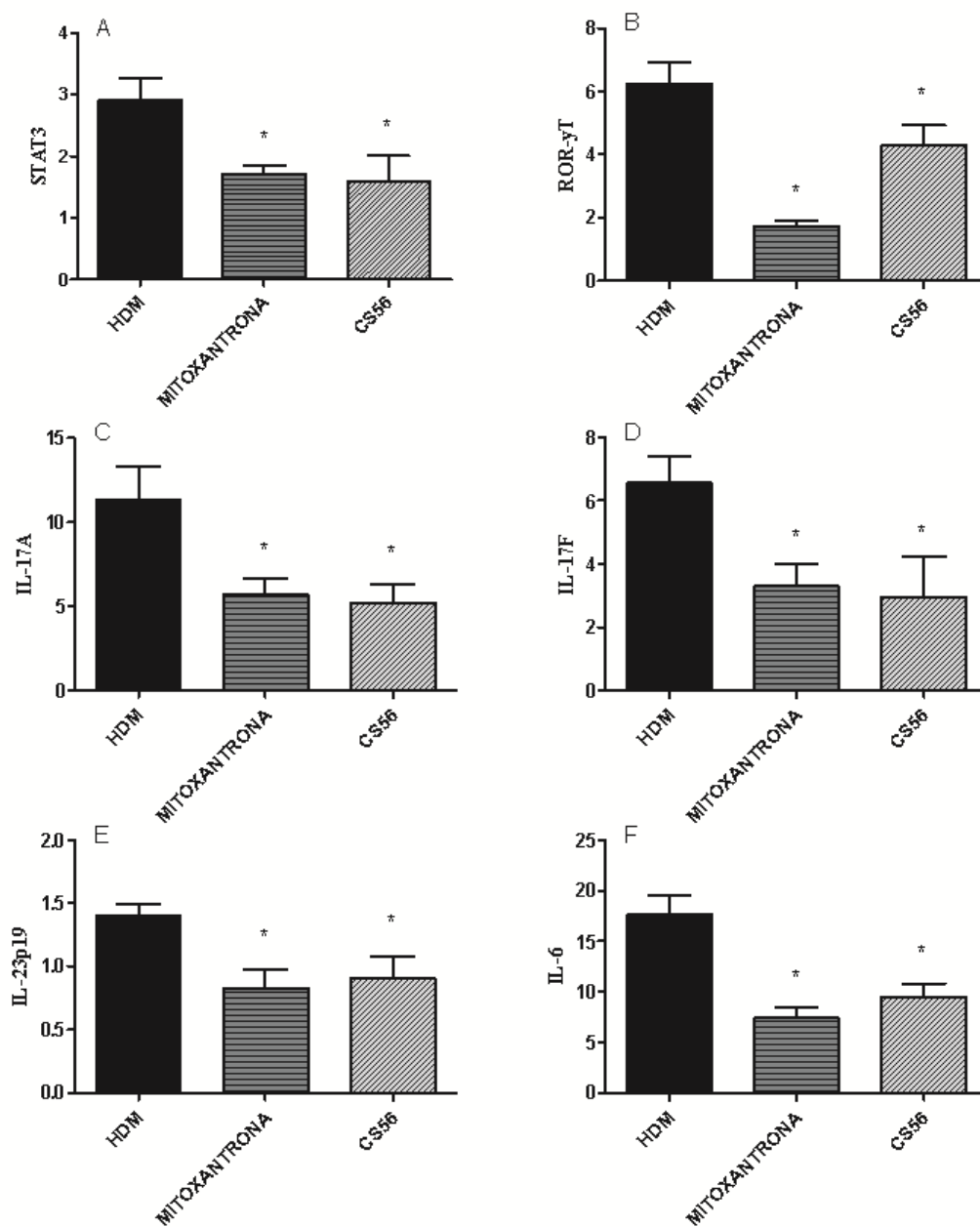


Figura 14 – Expressão de RNAm relacionados ao perfil Th17. Expressão relativa à salina de STAT3, ROR- γ T, IL-17A, IL-17F, IL-23p19 e IL-6 nas vias aéreas de camundongos AP induzidos e tratados (n = 8) ou não-tratados (n = 8) com 1mg/kg de MIT ou CS56. Cada barra representa a média aritmética \pm SEM. * p<0,05 quando comparados ao grupo HDM.

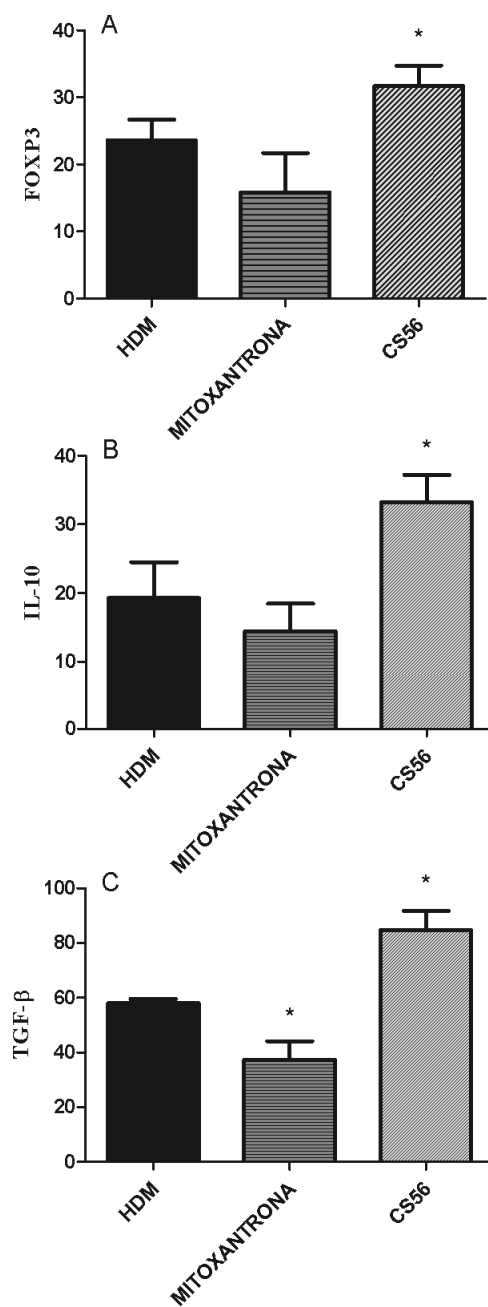


Figura 15 – Expressão de RNAm relacionados ao perfil Treg. Expressão relativa à salina de FOXP3, IL-10 e TGF- β nas vias aéreas de camundongos AP induzidos e tratados (n = 8) ou não-tratados (n = 8) com 1mg/kg de MIT ou CS56. Cada barra representa a média aritmética \pm SEM. * p<0,05 quando comparados ao grupo HDM.

4.5 DOSAGEM DE CITOCINAS NO SOBRENADANTE DE CULTURA DOS LINFONODOS PERIBRONQUIAIS

Os níveis de citocinas (IFN- γ , IL-13 e IL-5) foram quantificados no sobrenadante da cultura dos linfonodos peribronquiais e estão representados na figura 16. O tratamento com CS56 reduziu os níveis de IL-13 e IL-5 (Figura 16 A e B) e aumentou os níveis de IFN- γ (Figura 16 C) em comparação ao grupo HDM ($p < 0,05$). Coincidentemente, o tratamento com mitoxantrona apresentou os mesmos padrões do CS56 (Figura 16).

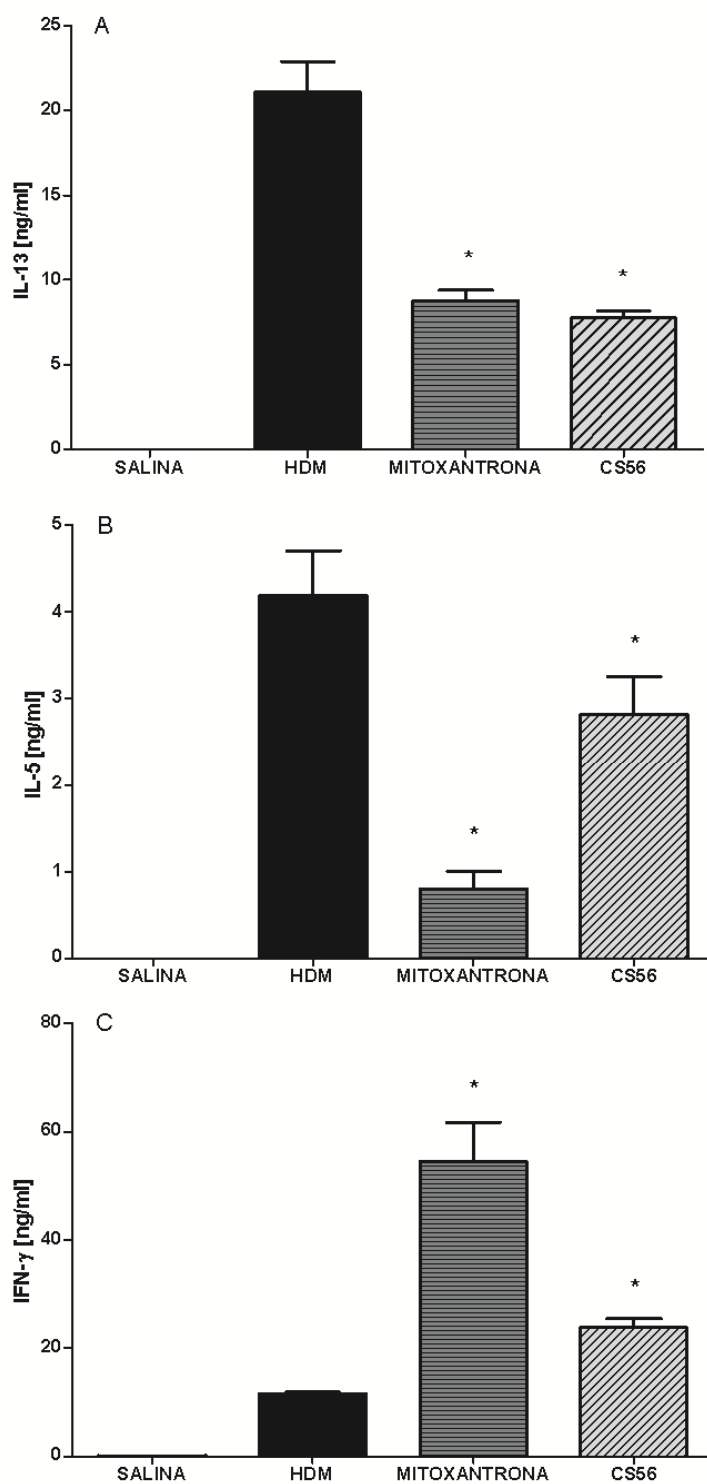


Figura 16 – Dosagem de citocinas no sobrenadante de cultura dos linfonodos peribronquiais de camundongos AP induzidos e tratados (n = 8) ou não-tratados (n = 8) com 1mg/kg de MIT ou CS56. Cada barra representa a média aritmética \pm SEM. * p<0,05 quando comparados ao grupo HDM.

4.6 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MARCADORES CELULARES

Para avaliar as possíveis alterações na expressão de marcadores celulares nos diferentes grupos experimentais, células pulmonares e de linfonodos peribronquiais foram submetidas à marcação e análise por citometria de fluxo. Os resultados da expressão dos marcadores celulares demonstraram que o grupo HDM apresentou um aumento de todos os marcadores quando comparados ao grupo salina (Figura 17), nos pulmões e nos linfonodos.

Com relação aos tratamentos, observou-se que MIT e CS56 reduziram o número absoluto de células que expressavam CD3, CD4, CD8 e CD19 nos pulmões (Figura 17A) e aumentaram os mesmos nos linfonodos dos camundongos (Figura 17B).

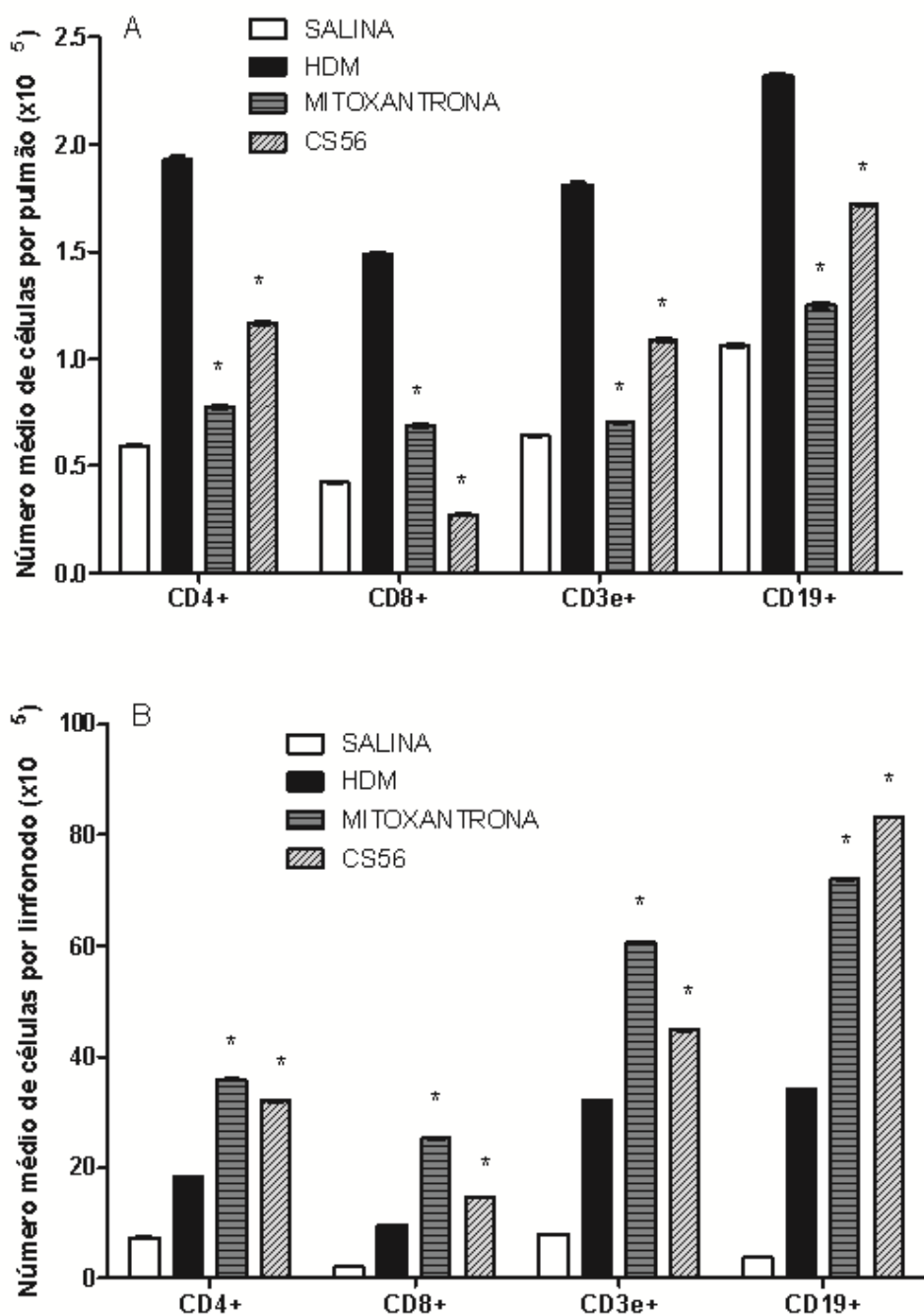


Figura 17 – Expressão de marcadores celulares. Expressão absoluta de CD4, CD8, CD3 e CD19 nos pulmões (A) e linfonodos peribronquiais (B) de camundongos AP induzidos e tratados (n = 8) ou não-tratados (n = 8) com 1 mg/kg de MIT ou CS56. Cada barra representa a média aritmética \pm SEM. * $p < 0,05$ quando comparados ao grupo HDM.

4.7 AVALIAÇÃO DA HRB NA EXACERBAÇÃO DA AP

A AP exacerbada pela infecção com RV foi utilizada para investigar as propriedades anti-inflamatórias do CS56 e da mitoxantrona nos camundongos BALB/c. Os camundongos do grupo HDM+RV apresentaram elevada resistência das vias aéreas frente à metacolina (Figura 18) em comparação aos camundongos infectados com RV inativado (UVRV). Após o tratamento com CS56 ou mitoxantrona, houve redução na resistência das vias aéreas (Figura 18).

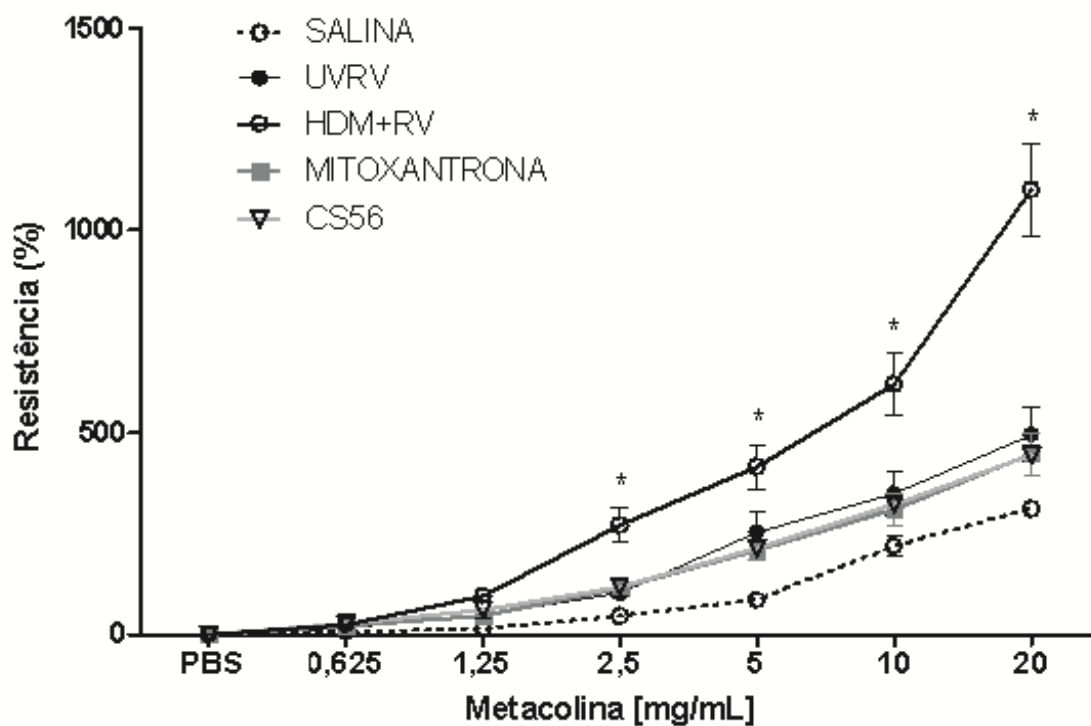


Figura 18 – Hiperresponsividade brônquica (HRB). Os animais foram submetidos à análise da HRB no 19º dia após a sensibilização. Os camundongos foram tratados (n = 8) ou não (n = 8) com 1 mg/kg de Mitoxantrona ou CS56 durante 6 dias. Cada ponto representa a média aritmética \pm SEM. *, $p < 0,05$ quando comparados os animais HDM+RV com todos os outros grupos.

4.8 AVALIAÇÃO DA CONTAGEM CELULAR NO LBA NA EXACERBAÇÃO DA AP

Para avaliar as possíveis alterações nos números celulares nos diferentes grupos experimentais, o LBA foi coletado e submetido a contagem por azul de trypan e May-Grunwald-Giemsa. A exacerbação da AP elevou o número total de células (Figura 19A) e por conseguinte o número de neutrófilos, linfócitos e, principalmente, eosinófilos (Figura 19B). O tratamento com mitoxantrona ou CS56 reduziu o número total de células e os números de neutrófilos, linfócitos e eosinófilos presentes no LBA (Figura 19A e B).

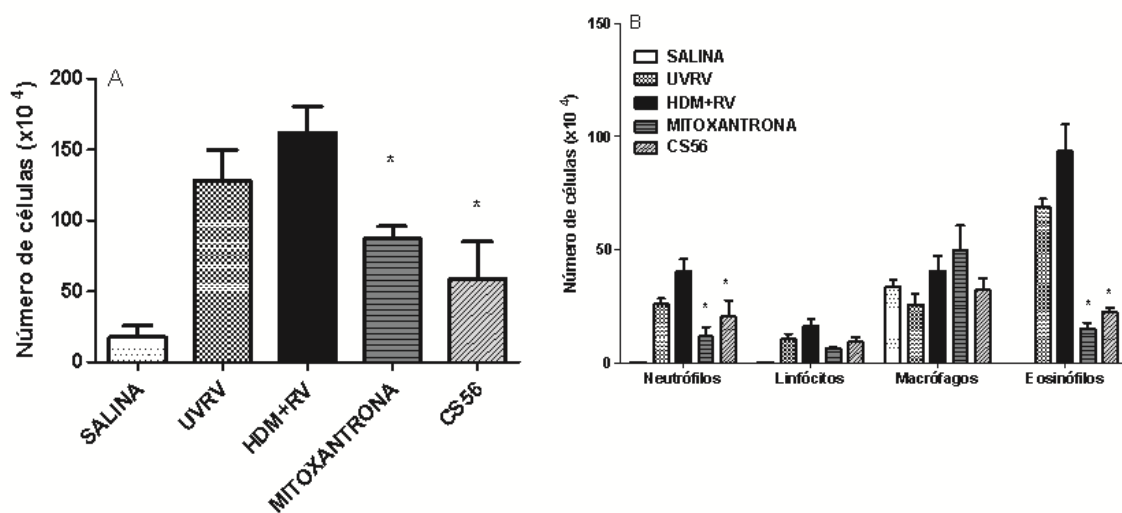


Figura 19 – Contagem de células no BAL. Contagem total (A) e diferencial (B) de células no BAL de camundongos HDM tratados ($n = 8$) ou não-tratados ($n = 8$) com 1mg/kg de MIT ou CS56 e do grupo salina ($n = 8$) no 19º dia. Cada barra representa a média aritmética \pm SEM. * $p < 0,05$ quando comparados ao grupo HDM.

4.9 CONTAGEM DO NÚMERO DE CÓPIAS VIRAIS NA EXACERBAÇÃO DA AP

Os camundongos do grupo HDM+RV apresentaram elevado número de cópias do vírus (Figura 20) em comparação aos camundongos infectados com RV inativado (UVRV) ou salina. Após o tratamento com CS56, houve redução no número de cópias virais presentes nas vias aéreas (Figura 20). O tratamento com mitoxantrona não reduziu o número de cópias virais (Figura 20).

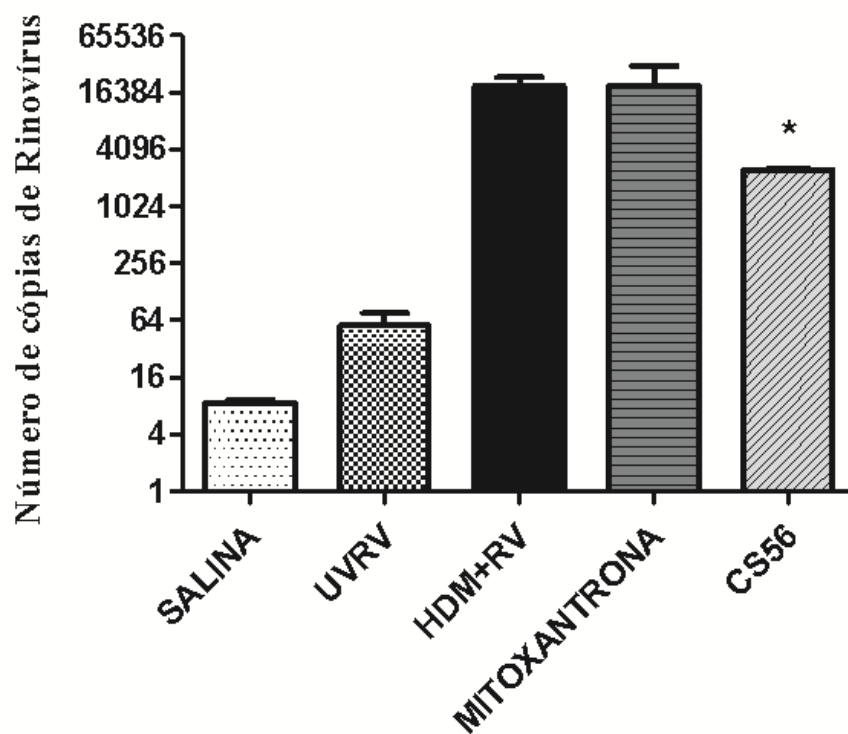


Figura 20 – Contagem de cópias virais. Os animais foram submetidos à contagem de cópias virais nas vias aéreas, por meio de qRT-PCR, no 19º dia após a sensibilização. Os camundongos foram tratados (n = 8) ou não (n = 8) com 1 mg/kg de Mitoxantrona ou CS56 durante 6 dias. Cada barra representa a média aritmética \pm SEM. *, $p < 0,05$ quando comparados aos animais HDM+RV.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo o tratamento com *O,O'*-di-(3'-iodopropil)-1,4-dihidroxi-antraquinona (CS56), derivado antraquinônico análogo da mitoxantrona, reduziu os fatores característicos da doença alérgica das vias aéreas, como hiperresponsividade, inflamação das vias aéreas com presença de eosinófilos, neutrófilos e linfócitos, recrutamento de células T para os pulmões, expressão de fatores de transcrição Th17 e hipersecreção de muco. Mais do que isso, o tratamento com CS56 foi capaz de induzir o aumento de fatores característicos de células Treg (FOXP3, IL-10 e TGF- β).

A asma é determinada como uma doença inflamatória aguda-a-crônica das vias aéreas com recrutamento de eosinófilos, hiperresponsividade bronquial (HRB), hiperplasia das células caliciformes e hipersecreção de muco (RABE et al., 2011). Além disso, o remodelamento das vias aéreas, como consequência da ação de citocinas e quimiocinas, é sinal característico da asma (DOHERTY; BROIDE, 2007). O tratamento com CS56 reduziu a AHR, o infiltrado de eosinófilos além de diminuir a produção de muco nos pulmões dos camundongos, levando a uma melhora da doença. Além disso, o tratamento reduziu o infiltrado de mastócitos nos pulmões. Cho e colaboradores (2012) demonstraram papel importante dos mastócitos durante a inflamação das vias aéreas, principalmente alterando a resposta de Th2 para uma resposta predominante de Th17, o que causa a exacerbação da asma.

Além disso, apesar da resposta imune na asma ser principalmente induzida pelas células do subtipo Th2, células dos subtipos Th1, Th17, mais recentemente Th9, assim como células T reguladoras, são capazes de modular a resposta imune aos alérgenos nos pulmões alérgicos (LLOYD; HESSEL 2010). Mais do que isso, McGrath e colaboradores (2012) demonstraram que um grande número de pacientes apresentam asma sem a infiltração característica de eosinófilos. Baraldo e colaboradores (2011) sugerem que mecanismos além da resposta Th2 podem estar envolvidos na patologia de alguns pacientes. O tratamento com CS56 reduziu a expressão gênica de fatores característicos de células Th17 e Th1, além de ter reduzido a liberação de citocinas de resposta Th2 (IL-13 e IL-5) e mais do que isso aumentou a expressão de fatores de células T reguladoras. Al-Ramli e colaboradores (2009), assim como, Kudo e colaboradores (2012) demonstraram que a IL-17 leva a um aumento a hiperresponsividade além da severidade dos casos de asma. Mais do que isso, o aumento da resposta de células Th17 ocasiona uma agravada infiltração de neutrófilos nos pulmões dos pacientes asmáticos acarretando na piora do quadro clínico da doença (WILSON et al., 2009, NAKAGOME; MATSUSHITA; NAGATA, 2012). Já a ativação de mecanismos

imunoreguladores, através da liberação de IL-10 e TGF- β , que fazem parte do perfil de células reguladoras, podem suprimir uma gama de mecanismos celulares (SEROOGY; GERN, 2005; von BOEHMER, 2005). Interessantemente, o tratamento com o CS56 foi capaz de aumentar a expressão de FOXP3 e também de IL-10 e TGF- β .

A infiltração de linfócitos T, CD4 e CD8, e de linfócitos B, nos pulmões dos pacientes asmáticos é um fato muito bem documentado (YING et al., 1997; LLOYD; HESSEL, 2010; SCANLON et al., 2011). O tratamento com CS56 reduziu os números de células expressando CD4, CD8, CD3 e CD19 nos pulmões, porém pode-se observar um aumento dos mesmos marcadores nos linfonodos drenantes dos pulmões, sugerindo que após o tratamento houve uma redução na migração destas células. Hutchison e colaboradores (2009) demonstraram que a migração de linfócitos para as vias aéreas inflamadas ocorrem em fluxos determinados que indicam fases distintas de localização e apresentação de antígenos. A disparidade na migração de células dos linfonodos drenantes para os locais de inflamação levam a redução na patologia e severidade da asma (PLE et al., 2010, LI et al., 2011).

As exacerbações da asma são manifestações comuns na vida do asmático, constituindo-se no evento mais temido pelo paciente por ser causa de grande morbidade. A asma severa corresponde por 5% a 10% dos casos e causa 50% do total de custos a saúde relacionados à asma (THOMSON; CHAUDHURI; SPEARS, 2011). A asma severa está associada ao aumento da produção de IL-17 (AL-RAMLI et al., 2009) e Lajoie e colaboradores (2010) sugeriram um papel crítico para o aumento de IL-23-Th17 através do aumento de IL-13. Alguns estudos já demonstraram que células produtoras de IL-17 podem levar a inflamação neutrofílica, o qual está relacionada à baixa função pulmonar, piora da asma e aumento das exacerbações (SIMPSON et al., 2006; AL-RAMLI et al., 2009; HASTIE et al., 2010). Com isso, a asma severa não é somente uma doença mediada pela resposta Th2, mas envolve a ativação anormal de células Th17 (WANG; WILLS-KARP, 2011) além do acúmulo de neutrófilos nas vias aéreas (WENZEL et al., 1997).

Além da exacerbação por desregulação nas funções celulares, as infecções, por exemplo, infecções virais, podem ocasionar o agravamento da asma (GAVALA; BERTICS; GERN, 2011, KIENINGER et al., 2012). O tratamento com CS56 foi capaz de reduzir a hiperresponsividade e o infiltrado celular na exacerbação causada pela infecção com o vírus da gripe. Além disso, o tratamento reduziu o número de cópias virais encontradas nas vias aéreas dos camundongos. Diferente do CS56, a mitoxantrona, apesar de ter reduzido a AHR, não foi capaz de reduzir o número de cópias virais. Estudos já demonstraram que derivados

antraquinônicos, incluindo a mitoxantrona, são capazes de reduzir as infecções virais (ANDERSEN et al., 1991; SEMPLE et al., 2001; DENG et al., 2007; XIONG et al., 2011; SCHWARZ et al., 2011; ALTMANN et al., 2012), porém a mitoxantrona é relacionada durante o tratamento a infecções oportunistas por vírus (NAKANO et al., 2011).

Conforme o exposto, os resultados obtidos pelo tratamento com *O,O'*-di-(3'-iodopropil)-1,4-dihidroxi-antraquinona sugerem potencial terapêutico deste análogo para a alergia pulmonar e conseqüentemente a asma, porém estudos clínicos são necessários para afirmar a eficácia deste composto.

6 CONCLUSÃO

O tratamento com o *O,O'*-di-(3'-iodopropil)-1,4-dihidroxi-antraquinona (CS56), derivado antraquinônico análogo da mitoxantrona, mostrou ser efetivo na melhora da alergia pulmonar através da modulação das respostas imunes envolvidas, tais como, redução do infiltrado de células, principalmente eosinófilos, da liberação de muco, dos níveis de IL-5 e IL-13 e aumento de IL-10 e FOXP3. Além disso, foi capaz de reduzir o efeito da exacerbação da AP por infecção viral, sugerindo um potencial terapêutico no tratamento da asma e da asma severa.

7 REFERÊNCIAS

ADCOCK, I. M.; CARAMORI, G.; CHUNG, K. F. New targets for drug development in asthma. **Lancet**, London, v. 372, p. 1073–1087, 2008.

AL-RAMLI, W. et al. T(H)17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 123, p. 1185–1187, 2009.

ALTMANN, S. E. et al. Inhibition of cowpox virus and monkeypox virus infection by mitoxantrone. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 93, p. 305-308, 2012.

ANDERSEN, D. O. et al. In vitro virucidal activity of selected anthraquinones and anthraquinone derivatives. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 16, p. 185-196, 1991.

AVERBECK, M. et al. Immunologic Principles of Allergic Disease. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, Berlin, v. 5, p. 1015-1028, 2007.

BARALDO, S. et al. Noneosinophilic asthma in children: relation with airway remodelling. **The European Respiratory Journal**, London, v. 38, p. 575-583, 2011.

BARCZYK, A.; PIERZCHALA, W.; SOZANSKA, E. Interleukin-17 in sputum correlates with airway hyperresponsiveness to methacholine. **Respiratory Medicine**, London, v. 97, p. 726–733, 2003.

BLUMENTHAL, M. N. Genetic, epigenetic, and environmental factors in asthma and allergy. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, Mclean, v. 108, p. 69-73, 2012.

BÖRGER, J. A. et al. Models of asthma: density-equalizing mapping and output benchmarking. **Journal of Occupational Medicine and Toxicology**, London, v. 3, p. S7, 2008.

BRAUN, A.; TSCHERING, T.; GRONEBERG, D. A. Experimental models of asthma. **Journal of Occupational Medicine and Toxicology**, London, v. 3, p. S1, 2008.

CHAKIR, J. et al. Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: effect of steroids on TGF-beta, IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 111, p. 1293–1298, 2003.

CHO, K. A. et al. IL-33 induces Th17-mediated airway inflammation via mast cells in ovalbumin-challenged mice. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, Bethesda, v. 302, p. L429-440, 2012.

CHU, X. et al. Effects of an anthraquinone derivative from *Rheum officinale* Baill, emodin, on airway responses in a murine model of asthma. **Food and Chemical Toxicology**, Exeter, v. 50, p. 2368-2375, 2012.

DENG, L. et al. Identification of novel antipoxviral agents: mitoxantrone inhibits vaccinia virus replication by blocking virion assembly. **Journal of Virology**, Washington, v. 81, p. 13392-13402, 2007.

DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA PARA O MANEJO DA ASMA, **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Brasília, v. 38, p. S1-S46, 2012.

DOHERTY, T.; BROIDE, D. Cytokines and growth factors in airway remodeling in asthma. **Current Opinion in Immunology**, London, v. 19, p. 676–680, 2007.

FERNANDEZ-RODRIGUEZ, S. et al. Establishing the phenotype in novel acute and chronic murine models of allergic asthma. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 8, p. 756-763, 2008.

FRANCO, R. et al. The economic impact of severe asthma to low-income families. **Allergy**, Copenhagen, v. 64, p. 478-483, 2009.

FREDRIKSSON, K. et al. Paradoxical effects of rapamycin on experimental house dust mite-induced asthma. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, p. e33984, 2012.

GAVALA, M. L.; BERTICS, P. J.; GERN, J. E. Rhinoviruses, allergic inflammation, and asthma. **Immunology Reviews**, Copenhagen, v. 242, p. 69-90, 2011.

GINA - Global Initiative for Asthma. Ed. 2011. Reino Unido. [acessado em 01 de Maio de 2012]. Disponível em: <http://www.ginasthma.org>.

HASTIE, A. T. et al. Analyses of asthma severity phenotypes and inflammatory proteins in subjects stratified by sputum granulocytes. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 125, p. 1028-1036, 2010.

HOLMES, A. M.; SOLARI, R.; HOLGATE, S. T. Animal models of asthma: value, limitations and opportunities for alternative approaches. **Drug Discovery Today**, Oxford, v. 16, p. 659-670, 2011.

HUNG, L. et al. Regulation of Airway Innate and Adaptive Immune Responses: The IL-17 Paradigm. **Critical Reviews in Immunology**, New York, v. 28, p. 269–279, 2008.

HUTCHISON, S. et al. An investigation of the impact of the location and timing of antigen-specific T cell division on airways inflammation. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 155, p. 107-116, 2009.

KANG, I. G.; JUNG, J. H.; KIM, S. T. Asian sand dust enhances allergen-induced th2 allergic inflammatory changes and mucin production in BALB/c mouse lungs. **Allergy, Asthma and Immunology Research**, Seoul, v. 4, p. 206-213, 2012.

KAWAKAMI, M. et al. The role of CCR7 in allergic airway inflammation induced by house dust mite exposure. **Cellular Immunology**, Orlando, v. 275, p. 24-32, 2012.

KIENINGER, E. et al. Rhinovirus infections in infancy and early childhood. **The European Respiratory Journal**, London, 2012. [Epub ahead of print]

- KOCH, M. et al. Role of local pulmonary IFN-gamma expression in murine allergic airway inflammation. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, New York, v. 35, p. 211-219, 2006.
- KUDO, M. et al. IL-17A produced by $\alpha\beta$ T cells drives airway hyper-responsiveness in mice and enhances mouse and human airway smooth muscle contraction. **Nature Medicine**, New York, v. 18, p. 547-554, 2012.
- LAJOIE, S. et al. Complement-mediated regulation of the IL-17A axis is a central genetic determinant of the severity of experimental allergic asthma. **Nature Immunology**, New York, v. 11, p. 928-935, 2010.
- LI, Z. et al. ECM1 controls T(H)2 cell egress from lymph nodes through re-expression of S1P(1). **Nature Immunology**, New York, v. 12, p. 178-185, 2011.
- LLOYD, C. M., HESSEL, E. M. Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 10, p. 838-848, 2010.
- LU, Y. et al. Emodin, a naturally occurring anthraquinone derivative, suppresses IgE-mediated anaphylactic reaction and mast cell activation. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 82, p. 1700-1708, 2011.
- MADDUR, M. S. et al. Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies. **The American Journal of Pathology**, New York, v. 181, p. 8-18, 2012.
- McGRATH, K. W. et al. A large subgroup of mild-to-moderate asthma is persistently noneosinophilic. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 185, p. 612-619, 2012.
- MEDEIROS, D. et al. Prevalência de sibilância e fatores de risco associados em crianças no primeiro ano de vida, residentes no Município de Recife, Pernambuco, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 27, p. 1551-1559, 2011
- McANULTY, R. J. Models and approaches to understand the role of airway remodelling in disease. **Pulmonary Pharmacology and Therapeutics**, London, v. 24, p. 478-486, 2011.
- NAKAGOME, K.; MATSUSHITA, S.; NAGATA, M. Neutrophilic inflammation in severe asthma. **International Archives of Allergy and Immunology**, New York, v. 158, p. 96-102, 2012.
- NAKANO, H. et al. A case of neuromyelitis optica with varicella zoster virus meningitis during mitoxantrone treatment. **Rinsho Shinkeigaku**, Tokyo, v. 51, p. 703-705, 2011.
- PLE, C. et al. Natural killer cells accumulate in lung-draining lymph nodes and regulate airway eosinophilia in a murine model of asthma. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oxford, v. 72, p. 118-127, 2010.
- RABE, K. F. et al. Can anti-IgE therapy prevent airway remodeling in allergic asthma? **Allergy**, Copenhagen, v. 66, p. 1142-1151, 2011.

- SEMPLE, S. J. et al. In vitro antiviral activity of the anthraquinone chrysophanic acid against poliovirus. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 49, p. 169-178, 2001.
- SEROOGY, C. M.; GERN, J. E. The role of T regulatory cells in asthma. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 116, p. 996-999, 2005.
- SCANLON, K. M. et al. IL-17A induces CCL28, supporting the chemotaxis of IgE-secreting B cells. **International Archives of Allergy and Immunology**, New York, v. 156, p. 51-61, 2011.
- SCHRÖDER, N. W. J.; MAURER, M. The role of innate immunity in asthma: leads and lessons from mouse models. **Allergy**, Copenhagen, v. 62, p. 579-590, 2007.
- SCHWARZ, S. et al. Emodin inhibits current through SARS-associated coronavirus 3a protein. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 90, p. 64-69, 2011.
- SHENOLIKAR, R. et al. Costs of asthma among US working adults. **The American Journal of Managed Care**, Plainsboro, v. 17, p. 409-416, 2011.
- SHI, H.; QIN, X. CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes in allergy and asthma. **Allergy**, Copenhagen, v. 60, p. 986-995, 2005.
- SIMPSON, J. L. et al. Inflammatory subtypes in asthma: assessment and identification using induced sputum. **Respirology**, Carlton, v. 11, p. 54-61, 2006.
- THOMSON, N. C.; CHAUDHURI, R.; SPEARS, M. Emerging therapies for severe asthma. **BMC Medicine**, London, v. 9, p. 102, 2011.
- VIEIRA, R. P. et al. Aerobic Exercise Decreases Chronic Allergic Lung Inflammation and Airway Remodeling in Mice. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 176, p. 871-877, 2007.
- von BOEHMER, H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. **Nature Immunology**, New York, v. 6, p. 338-344, 2005.
- WANG, Y. H.; WILLS-KARP, M. The potential role of interleukin-17 in severe asthma. **Current Allergy and Asthma Reports**, Philadelphia, v. 11, p. 388-394, 2011.
- WENZEL, S. E. et al. Bronchoscopic evaluation of severe asthma. Persistent inflammation associated with high dose glucocorticoids. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 156, p. 737-743, 1997.
- WILSON, R. H. et al. Allergic sensitization through the airway primes Th17-dependent neutrophilia and airway hyperresponsiveness. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 180, p. 720-730, 2009.
- XIONG, H. R. et al. The effect of emodin, an anthraquinone derivative extracted from the roots of *Rheum tanguticum*, against herpes simplex virus in vitro and in vivo. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 133, p. 718-723, 2011.

YING, S. et al. Expression of IL-4 and IL-5 mRNA and protein product by CD4⁺ and CD8⁺ T cells, eosinophils, and mast cells in bronchial biopsies obtained from atopic and nonatopic (intrinsic) asthmatics. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 158, p. 3539-3544, 1997.

YU, H. et al. Interleukin-13 induces mucin 5AC production involving STAT6/SPDEF in human airway epithelial cells. **Cell Communication and Adhesion**, London, v. 17, p. 83-92, 2010.

ANEXOS

ANEXO A – ARTIGOS PUBLICADOS

ANTHRAQUINONE DERIVATIVE O,O'-BIS-(3'-IODOPROPYL)-1,4-DIHDROXYANTHRAQUINONE
MODULATES IMMUNE RESPONSE AND IMPROVES EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE
ENCEPHALOMYELITIS.

ALVES CC, CASTRO SB, COSTA CF, DIAS AT, ALVES CJ, RODRIGUES MF, TEIXEIRA HC,
ALMEIDA MV, FERREIRA AP.

INTERNATIONAL IMMUNOPHARMACOLOGY 14, p. 127-132, 2012

DOI INFORMATION: 10.1016/J.INTIMP.2012.06.013



Preliminary report

Anthraquinone derivative *O,O'*-bis-(3'-iodopropyl)-1,4-dihydroxyanthraquinone modulates immune response and improves experimental autoimmune encephalomyelitis

Caio C.S. Alves ^a, Sandra B.R. Castro ^a, Cristiane F. Costa ^b, Alyria T. Dias ^a, Chrystian J. Alves ^a, Michele F. Rodrigues ^a, Henrique C. Teixeira ^a, Mauro V. Almeida ^b, Ana Paula Ferreira ^{a,*}

^a Department of Parasitology, Microbiology and Immunology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, 36036-900 Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

^b Department of Chemistry, Federal University of Juiz de Fora, 36036-900 Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 April 2012

Received in revised form 6 June 2012

Accepted 16 June 2012

Available online 29 June 2012

Keywords:

Cytokines

EAE

Mitoxantrone analog

Multiple sclerosis

Chemokines

ABSTRACT

The present study investigated the effects of the anthraquinone derivative (*O,O'*-bis-(3'-iodopropyl)-1,4-dihydroxyanthraquinone – DIPDHAQ), mitoxantrone analog, in an experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model. The results showed that DIPDHAQ treatment improved the clinical signs of the disease ($n = 10$; vehicle: 3.8 ± 0.3 ; DIPDHAQ: 1.4 ± 0.9). The improvement was associated with a decrease of inflammatory cells, demyelination, IL-17, IFN- γ , IL-12p40, IL-6, TGF- β , CCL5 and CCL20 levels in the spinal cord. DIPDHAQ presented a low cytotoxicity when *in vitro* assays were performed. Therefore, the findings suggest a major role for DIPDHAQ in multiple sclerosis, disease characterized as an autoimmune inflammatory disorder against myelin proteins of the brain and spinal cord. The attenuation of inflammation and consequently improvement of clinical signs, involving a decrease of pro-inflammatory cytokines and the low cytotoxicity of DIPDHAQ, suggest that this compound could be used as an alternative treatment for autoimmune diseases in the central nervous system.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Multiple Sclerosis (MS) is an autoimmune inflammatory disease directed against myelin proteins and is the most common human demyelinating disease of the central nervous system (CNS) [1]. It was demonstrated that the loss of myelin proteins leads to loss of sensitivity, muscle weakness, difficulties with coordination, balance, bladder and bowel that are standard hallmarks of the pathology [2,3]. A large number of cytokines and chemokines play pivotal role in the establishment and maintenance of autoimmune disorders [4]. In the present study, the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model was used because it resembles many features of MS such as T-cell mediated autoinflammation in the CNS [5].

It has been demonstrated that the anticancer agent mitoxantrone (MIT), which is an anthracene-based molecule, was efficient in treating MS and its actions are believed to be due to nonspecific inhibition of T cell and B cell proliferation and macrophage activation [6]. MIT was first tried in the EAE model in the mid-1980s, successfully reversing paralysis and reducing the number and extent of perivascular lesions in brain [7]. Clinical development of mitoxantrone was taken forward in the clinic, leading to its approval for use in MS. In 2000 the FDA approved its use in secondary progressive MS and progressive

or worsening relapsing–remitting MS. The treatment with MIT normally causes myelosuppression and, depending on the total cumulative dose, several side effects can be observed, moreover, recent studies question the efficacy of mitoxantrone and the safety in long-term treatments [7,8]. Therefore, there is a need to develop effective and less toxic drugs, with specific effectiveness in reducing the action of autoreactive immune cells.

In this study, treatment with the anthraquinone derivative *O,O'*-bis-(3'-iodopropyl)-1,4-dihydroxyanthraquinone (DIPDHAQ), a mitoxantrone analog, improved the clinical signs of MOG-induced EAE. These improvements were associated with reduction of inflammatory cytokines in the spinal cord. Overall, the results indicate DIPDHAQ as a new candidate compound for the treatment of MS.

2. Materials and methods

2.1. Chemical compounds

Mitoxantrone (MIT) was kindly provided by “Quiral Química do Brasil S.A.”. The compound *O,O'*-bis-(3'-chloropropyl)-1,4-dihydroxyanthraquinone (compound **1**) was prepared by treatment of the 1,4-dihydroxyanthraquinone (DHAQ, ACROS) with potassium carbonate and 1-bromo-3-chloropropane, in butanone under reflux. Reaction of compound **1** with sodium iodide in butanone at reflux furnished DIPDHAQ (Fig. 1). DIPDHAQ was

* Corresponding author. Tel./fax: +55 32 21023214.
E-mail address: ana.paula@ufjf.edu.br (A.P. Ferreira).

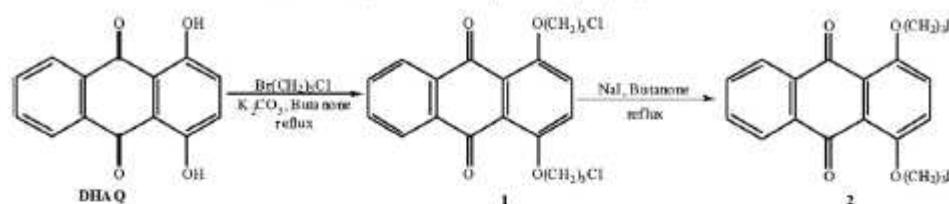


Fig. 1. Chemical structures: (DBHQ, ACROS) 1,4-Dihydroxyanthraquinone, (compound 1) 0,0'-bis-(3'-chloropropyl)-1,4-dihydroxyanthraquinone, (DIPDHAQ) 0,0'-bis-(3'-iodopropyl)-1,4-dihydroxyanthraquinone.

purified by column chromatography and characterized by infrared and NMR spectroscopy.

2.2. *In vitro* assay

J774A.1 cells were maintained in RPMI-1640 supplemented (2 mM L-glutamine, $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ of streptomycin and penicillin, 5% fetal bovine serum) at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 . Peritoneal macrophages of naive mice were isolated by intraperitoneal injection of 2.0 ml of sterile 3% thioglycollate (Sigma Chemical Co., Saint Louis, USA). After 3 days, mice were sacrificed; the peritoneal cavity was rinsed with 5 ml ice-cold PBS containing 0.1% BSA and $20 \mu\text{mol/l}$ disodium EDTA. Cell viability by trypan blue exclusion was >95%. Cells were seeded in 96-well plates at a density of 1×10^6 cells/ml. Cells were incubated at 37°C in 5% CO_2 in the presence of mitoxantrone or DIPDHAQ (25, 5, 1 and $0.2 \mu\text{g/ml}$) for 48 h. Mitoxantrone and its analog DIPDHAQ were solubilized in dimethyl sulfoxide (DMSO – Sigma St. Louis, MO, USA), never exceeding 0.1% (v/v), and diluted in RPMI-1640 (Gibco, Grand Island, USA) before use.

2.3. MTT assay

Cell viability was measured using the 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) test in non-stimulated cell cultures. After 48 h of culture the supernatant was removed and the cells were incubated with 100 μl of supplemented RPMI medium and 10 μl of MTT (5 mg/ml) for 4 h at 37°C in 5% CO_2 . The reaction was stopped by adding to each well 100 μl of an acidic isopropanol solution (100 ml of isopropyl alcohol/0.4 ml of HCl 10 N). Following 10 min of incubation at room temperature, the optical density (OD) values at 570 nm were determined (Spectramax 190; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) [9,10].

2.4. Animals

Female C57Bl/6 mice 6–8 weeks old were obtained from the Animal Care Facilities of the Federal University of Juiz de Fora (UFJF) and housed in microisolator cages at the Laboratory of Immunology. All procedures were in accordance with the principles of the Brazilian Code for the Use of Laboratory Animals. This project was approved by the Ethics Committee on the use of laboratory animals from UFJF.

2.5. EAE induction and DIPDHAQ treatment

Groups of 10 mice were subcutaneously (s.c.) immunized or not at both sides of the tail base with 100 μg of MOG_{35–55} peptide (Sigma) emulsified vol/vol in complete Freund's adjuvant (CFA) (Sigma) supplemented with 400 μg of attenuated *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (Difco, Detroit, USA). Pertussis toxin, 300 ng/animal (Sigma), was injected intraperitoneally (i.p.) on the day of immunization and 48 h later. Non-immunized mice were used as control.

Immunized mice were divided into three groups (n=10 mice per group): immunized not-treated (EAE group), immunized and

treated with DIPDHAQ (DIPDHAQ group) and immunized and treated with Mitoxantrone (MIT group). The EAE group received only vehicle i.p., DIPDHAQ group or MIT group received 1 mg/kg body weight of DIPDHAQ or mitoxantrone, respectively, in 0.1% DMSO i.p. daily for 7 days since the 14th day post-immunization [11].

2.6. Clinical assessment

Mice were weighed and observed daily for clinical signs of EAE up to 21 dpi. The clinical status was assessed scoring certain parts of the mice body individually according to Table 1 [12,13]. In case of death, mice were scored 15. The final daily clinical score was obtained adding all individual scores assessed.

2.7. Cytokine and chemokines production in the spinal cord

Spinal cord tissue samples were obtained from control and immunized mice at day 21 post-immunization and weighted. One hundred milligrams of tissues was homogenized in 1 ml of 0.4 M NaCl, 0.05% Tween 20 (Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, USA), containing 0.5% bovine serum albumin (BSA), 0.1 M phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 0.1 M benzethonium chloride, 10 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and 20 kIU/ml aprotinin (Sigma). The supernatants were collected to determine the concentration of IL-17, IFN- γ , IL-12p40, IL-6, TGF- β , CCL20 and CCL5 at 1:10 dilution in 1% BSA in phosphate buffered saline (PBS). Concentrations were assayed by ELISA using commercially available antibodies and according to the procedures supplied by the manufacturer (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA).

2.8. Preparation of spinal cord and histological staining

To evaluate spinal cord tissue histology, five mice per group were euthanized under anesthesia perfused by intracardiac puncture with 5 ml of 4% buffered formalin on day 21 post-immunization. The spinal

Table 1
Clinical score assessment.

Part of the body	Clinical signs	Score ^a
Tail	No clinical signs	0
	Loss of muscle tone in tail	1
	Paralysis	2
Hind-limb	No clinical signs	0
	Weakness of one animal paw	1
	Weakness of both animal paws	2
	Paralysis of one animal paw	3
Front-limb	Paralysis of both animal paws	4
	No clinical signs	0
	Weakness of any animal paw	1
Bladder	Paralysis of any animal paw	2
	Continence	0
	Incontinence	1

^a Numerical score arbitrarily established.

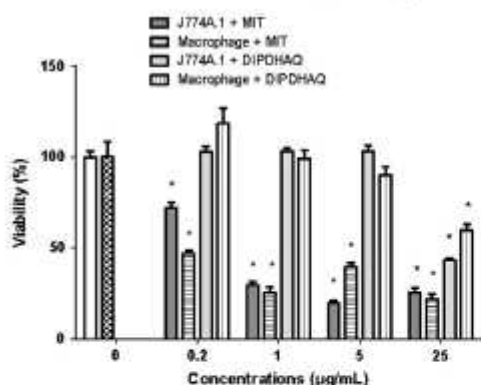


Fig. 2. Cytotoxicity assay. Primary mice peritoneal macrophages (pattern bars) and J774A.1 cells (plain bars) were cultured by 48h in the presence of serial dilutions of MIT and DIPDHAQ (25 µg/ml to 0.2 µg/ml). Cells were collected to determine the percentage of cytotoxicity by the MIT test. Each bar represents the arithmetic mean \pm SEM. *, $p < 0.05$ when compared to control (not treated cells). Control cells (0 µg/ml) peritoneal macrophages (pattern bar) and J774A.1 cells (white bar). Results are representative of three different experiments.

cords were fixed in 4% buffered formalin and embedded in paraffin. 8-µm-thick sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) or 10-µm-thick sections were stained with Luxol fast blue (LFB)-cresyl violet, to assess tissue damage, inflammation and demyelination.

2.9. Statistics

Results presented here represent three independent experiments and are presented as the mean \pm SEM. The significance of differences between groups was analyzed using a Student's *t*-test, Mann-Whitney test, or two-way ANOVA (GraphPad Prism 5.00) when appropriate. The differences were considered significant at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. DIPDHAQ treatment showed lower cytotoxicity on macrophages

Cytotoxicity was evaluated as cellular viability in the presence of various concentrations of the tested compounds. DIPDHAQ did not present cytotoxic effect in almost all concentrations tested; reducing the viability to ~50% only in the highest concentration used (25 µg/ml) in J774A.1 macrophage lineage and in mice peritoneal macrophages

(Fig. 2). However, mitoxantrone was cytotoxic at all concentrations tested, demonstrating the lower toxicity of DIPDHAQ (Fig. 2).

3.2. Neurological deficits

The axonal damage in mice suffering from EAE is represented by well defined signs such as tail paralysis and hind-limb weakness [11,12]. Fig. 3A shows that immunized mice presented EAE signs such as weakness/paralysis of tail and limbs, which became apparent around days 10–12 following immunization. Moreover, intraperitoneal injections of DIPDHAQ and MIT demonstrated to be effective in treating MOC_{25–55}-EAE-induced mice. Clinical signs of disease in the treated groups showed a minor peak at day 16 after immunization (MIT: 2.3 ± 1.02 ; DIPDHAQ: 2.2 ± 1.03) maintaining lower clinical score, while the untreated group peaked at day 19 (3.8 ± 0.58), with an elevated clinical score. From the day 17, the group treated with DIPDHAQ showed pronounced differences in clinical score ($p < 0.05$) in comparison with the EAE group (Fig. 3A). The injections of neither DIPDHAQ nor MIT influenced mean weight compared to non-immunized control or EAE (Fig. 3B).

3.3. Histological evaluation

Spinal cord inflammation and demyelination (Fig. 4A) were performed at 21st day post-immunization. Mice from the DIPDHAQ group presented reduced inflammation and demyelination when compared to EAE group (Fig. 4A). Spinal cord of EAE group showed inflammatory cell infiltrates in the leptomeningeal sites when compared to negative control (Fig. 4A). Inflammatory cell infiltrates were associated to vacuolation and secondary degeneration of parenchyma, consistent with demyelination (Fig. 4A).

3.4. Spinal cord chemokine analyses

CCL20 and CCL5 levels in supernatants from macerates of spinal cord were measured at day 21 post-immunization (Fig. 4B and C). The EAE group showed higher chemokine levels (Fig. 4B and C) when compared to non-immunized control group ($p < 0.05$). The group treated with DIPDHAQ showed significant ($p < 0.05$) lower levels in comparison with the EAE group (Fig. 4B and C). MIT treatment increased CCL5 (Fig. 4B).

3.5. Spinal cord cytokine analyses

IL-17, IFN- γ , IL-12p40, IL-6 and TGF- β levels in supernatants of spinal cord macerates were measured at day 21 post-immunization. The EAE group showed increased levels of IL-17, IFN- γ , IL-12p40 and IL-6 (Fig. 5A–D) when compared to the non-immunized control

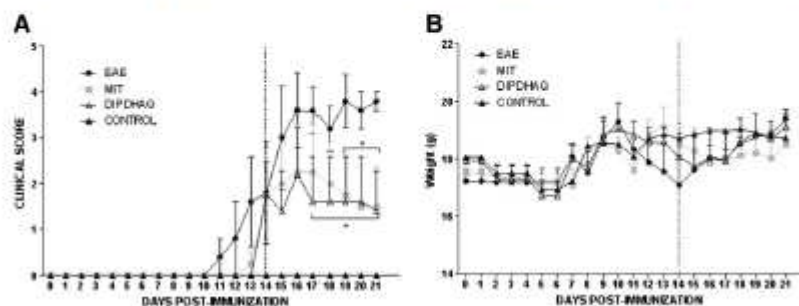


Fig. 3. Clinical assessment. Animals were monitored daily for clinical signs of EAE after immunization with 100 µg MOC_{25–55} peptide. Mice were treated ($n = 10$) or not ($n = 10$) with 1 mg/kg body weight of DIPDHAQ or MIT during 7 days. (A) Clinical scores of EAE mice treated or not with MIT or DIPDHAQ. (B) Mean weight of EAE mice treated or not with MIT or DIPDHAQ. Each point represents the arithmetic mean \pm SEM. Dashed line: beginning of the treatment. *, $p < 0.05$.

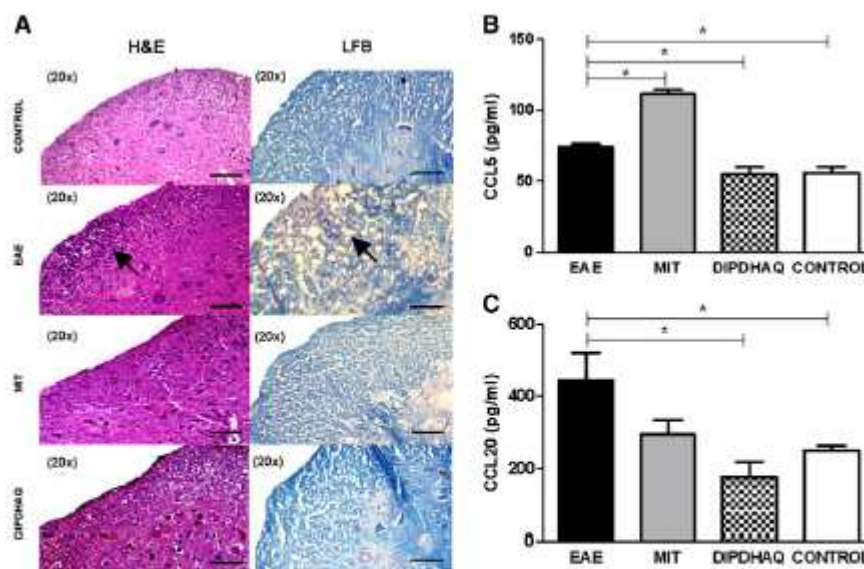


Fig. 4. Disease parameters. At 21 dpi spinal cords were removed, fixed and embedded in paraffin. (A) Histology of spinal cord, H&E and LFB. EAE group showed inflammatory sites (arrows) and secondary degeneration of parenchyma with demyelination. Bar = 50 μ m. (B,C) Chemokine level. Spinal cords were removed and homogenized in an extraction solution (100 mg of tissue per 1 ml). Supernatants were collected to determine the concentration of CCL5 (B) and CCL20 (C). Each bar represents the arithmetic mean \pm SEM. *, $p < 0.05$. Results are representative of three different experiments.

group ($p < 0.05$). The DIPDHAQ group showed lower levels of IL-17, IFN- γ , IL-12p40, IL-6 and TGF- β (Fig. 5A to E) in comparison with the EAE group ($p < 0.05$). Surprisingly, only IL-17 and IL-12p40 were significantly decreased in mice treated with MIT (Fig. 5A and D) in comparison with the EAE group.

4. Discussion

The present study demonstrated that treatment with the anthraquinone derivative *O,O'*-bis-(3'-iodopropyl)-1,4-dihydroxyanthraquinone (DIPDHAQ), improved clinical signs of MOG-induced EAE in C57B/6 mice. Amelioration of EAE was associated with lower levels of inflammatory cytokines in the spinal cord. DIPDHAQ had reduced *in vitro* cytotoxicity in comparison with mitoxantrone (MIT).

MIT is recommended as a first line drug for patients with malignant forms of MS and as a second line drug in those with relapsing-remitting MS and the secondary progressive MS [14,15]. Although data on long-term efficacy and safety of MIT in MS patients and the real mechanism of MIT action are still unknown, recent studies suggested that disease remission is well maintained in treated patients [7]. Moreover, it is believed that nonspecific cytotoxicity effects on macrophages and lymphocytes are the major mechanisms responsible for the clinical effects of MIT in MS patients [11]. The present study showed high *in vitro* cytotoxicity of MIT on macrophages which could be related with the reduced clinical score of the MIT treated mice. In the search for analogs with optimal therapeutic efficacy, the primary structural changes introduced into the anthracene-9,10-dione have been (a) variation of the alkylamino side chain and (b) repositioning of the hydroxy substituents and/or the alkylamino side chains of the anthracenedione chromophore [16]. The elevated cytotoxicity of mitoxantrone could be related to the presence of the N-O-O triangulation, which increases DNA binding potency [17]. Moreover, the reduced cytotoxicity of DIPDHAQ could be related to the absence of 5,8 hydroxyl groups in the aromatic ring.

Different studies related the presence of these groups to cytotoxicity and notably the cardiotoxicity of mitoxantrone [16–19]. The concentration of 25 μ g/ml in the *in vitro* tests was used to determine a parameter between MIT and DIPDHAQ in higher doses. Treatment with higher doses of MIT normally shows plasma values [20] lower than 25 μ g/ml, the concentration used in this study, which diminishes the significance of the DIPDHAQ cytotoxic parameter result.

The results presented here indicate that treatment with DIPDHAQ improves the clinical score of EAE. This improvement was correlated with lower levels of CCL5, CCL20, IL-17, IFN- γ , IL-12p40, IL-6 and TGF- β in the spinal cord and with both less inflammation and less demyelination.

The migration of leukocytes to the CNS is orchestrated by chemokines produced by endothelial cells, perivascular macrophages, astrocytes, and microglia [21]. It has been demonstrated that the blockade of CCR6, a CCL20 receptor, inhibited the development of EAE due to reduced priming of a autoreactive CD4+ T cells [22]. The reduced levels of CCL5 and CCL20 at the spinal cord in the present work could be related with reduced recruitment of IFN- γ -producing CD4 cells (CCL5) and IL-17-producing CD4 cells (CCL20), which could explain the reduced inflammatory cell infiltrate, and the lower demyelination in the DIPDHAQ treated group, causing improvement in clinical signs.

Demyelination in EAE, such as in MS, is a result of the inflammatory lesions in the white matter leading to clinical deficits [23]. The treatment with DIPDHAQ reduced the demyelination in spinal cord suggesting a correlation with the lower clinical signs.

IL-17 and IFN- γ play important roles in the induction and severity of MS and EAE [24,25]. Moreover, the deficiency of IL-17 or the use of IL-17-blocking antibodies prevented the development and/or reduced the severity of EAE [24]. IFN- γ is also involved in the induction and severity of EAE but recent studies showed that IFN- γ secreting cells infiltrate the brain during the development of EAE, but these

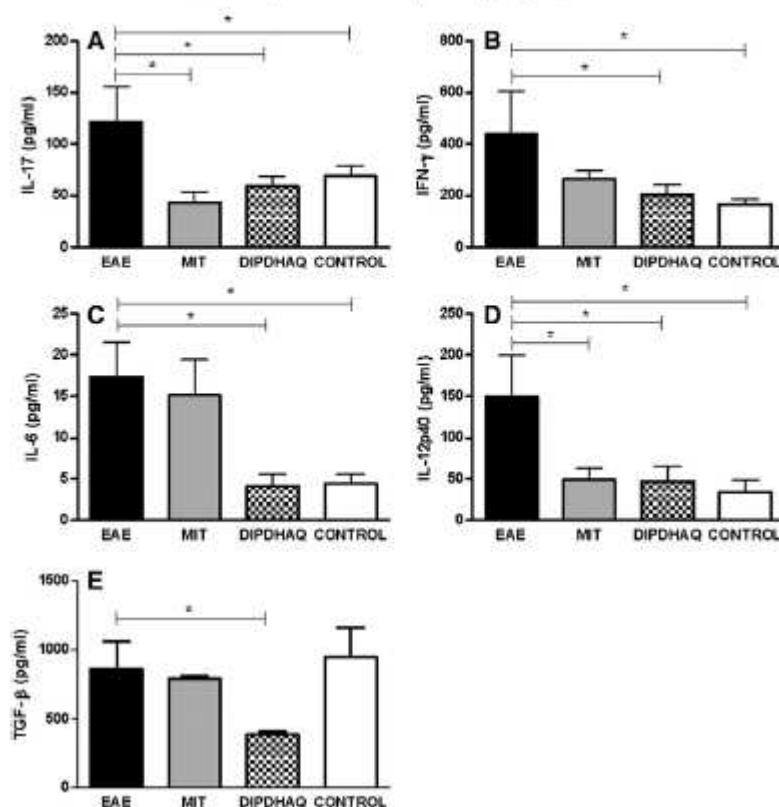


Fig. 5. Cytokine level. At 21 dpi spinal cords were removed and homogenized in an extraction solution (100 mg of tissue per 1 ml). Supernatants were collected to determine the concentration of IL-17 (A), IFN- γ (B), IL-6 (C), IL-12p40 (D), and TGF- β (E). Each bar represents the arithmetic mean \pm SEM. *, $p < 0.05$. Results are representative of three different experiments.

cells are not detected in significant numbers on days 10–14, which follows the onset of clinical symptoms [25,26]. Furthermore, it has been suggested that EAE can be induced by transferring T cells that secrete IL-17, but not by T cells that secrete IFN- γ , although both types of cells can cross the blood–brain barrier and infiltrate the CNS [27]. Therefore, based in the results presented here, the above pathway seems to be correlated with DIPDHAQ effects, leading to a decreased inflammation and reduction of EAE signs.

IL-12 has also been considered important in EAE, where studies of IL-12 subunits (IL-12p35 and IL-12p40) revealed that p40 $^{-/-}$ mice were resistant to EAE development, whereas p35 $^{-/-}$ mice were susceptible to EAE [28,29]. Considering that IL-12p40 subunit is also part of IL-23, special attention was given to IL-23 in EAE, and it is believed that p40 $^{-/-}$ mice were resistant to EAE as a result of decreased IL-23 activity and point to a minor role of IL-12 for EAE development [30]. In accordance, the present study has demonstrated a reduction in IL-12p40 levels after DIPDHAQ treatment, which could be associated with lower number of IL-17 producing cells and improved clinical score.

IL-6 is known to be involved in CNS inflammation and pathology of EAE, either directly through activation of microglia and astrocytes [31] or indirectly, together with TGF- β , by promoting the differentiation and expansion of Th17 cells [32]. In the present work DIPDHAQ treatment decreased the levels of IL-6 and TGF- β , which could have affected IL-17 production.

In conclusion, treatment with DIPDHAQ (3,3'-bis-(3'-iodopropyl)-1,4-dihydroxyanthraquinone) showed to be effective in improving the clinical signs of EAE, which appears to be associated with lower levels of CCL5, CCL20, IFN- γ and IL-17 in the spinal cord. The role played by CCL5 and CCL20 in modulating IFN- γ and IL-17 production and ameliorating EAE and MS deserves further attention.

Acknowledgments

This work was supported in part by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (481797/07-6; 303369/2009-4), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

- [1] Pugliatti M, Sotgiu S, Rocati G. The worldwide prevalence of multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg* 2002;104:182–90.
- [2] Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet* 2002;359:1221–31.
- [3] Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet* 2008;372:1502–17.
- [4] Hedegaard CJ, Kraker M, Bendtzen K, Lund H, Selvig F, Nielsen CH. T helper cell type 1 (Th1), Th2 and Th17 response to myelin basic protein and disease activity in multiple sclerosis. *Immunology* 2008;125:161–9.
- [5] Kuchino VK, Anderson AC, Waldner H, Muder M, Bettelli E, Nicholson LB. T cell response in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): role of self and

- cross-reactive antigens in shaping, tuning, and regulating the auto-pathogenic T cell repertoire. *Annu Rev Immunol* 2002;20:101–23.
- [6] Wang BS, Lamaglia AJ, Silva J, Rocca LA, Maltoni VM, Durr FE. Inhibition of the induction of auto-reactivity with mitoxantrone. *Int J Immunopharmacol* 1986;8:967–73.
 - [7] Galera SL, Marlowitz C. US FDA-approved disease-modifying treatments for multiple sclerosis: review of adverse effect profiles. *CNS Drugs* 2005;19:239–52.
 - [8] Marlow JJ, Miyasaki JM, Gonnath G, O'Connor PW. Evidence report: the efficacy and safety of mitoxantrone (Novantrone) in the treatment of multiple sclerosis: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 2010;74:1461–70.
 - [9] Teixeira M, Coqueiro F, Barbosa CM, Nascimento MS, Brito M. Improvement of the inhibitory effect of xanthones on NO production by encapsulation in PLGA nanocapsules. *J Drug Target* 2005;13:129–35.
 - [10] Coma TA, Reis EPC, Alves IL, Alves CCS, Castro SBR, Dias AT, et al. Preparation of amino alcohols condensed with carbohydrates: evaluation of cytotoxicity and inhibitory effect on NO production. *Chem Biol Drug Des* 2010;76:451–6.
 - [11] Piao WH, Wong B, Bai XF, Huang J, Campagnolo DI, Door RT, et al. Therapeutic effect of anthracene-based anticancer agent etoposide in an animal model of multiple sclerosis. *J Immunol* 2007;179:7415–23.
 - [12] De Paula MI, Rodrigues DH, Teixeira HC, Barsante MM, Souza MA, Ferreira AP. Genistein down-modulates pro-inflammatory cytokines and reverses clinical signs of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Int Immunopharmacol* 2008;8:1291–7.
 - [13] Castro SBR, Junior COR, Alves CCS, Dias AT, Alves IL, Mazzoccoli L, et al. Immunomodulatory effects and improved prognosis of experimental autoimmune encephalomyelitis after O-tetra-deca-nyl-genistein treatment. *Int Immunopharmacol* 2012;12:465–70.
 - [14] Fox EJ. Management of worsening multiple sclerosis with mitoxantrone: a review. *Clin Ther* 2006;28:461–74.
 - [15] Neuhaut O, Kieseier BC, Hartung HP. Therapeutic role of mitoxantrone in multiple sclerosis. *Pharmacol Ther* 2006;109:198–209.
 - [16] Drewinko B, Yang LY, Balogh B, Trujillo JM. Comparative cytotoxicity of bisantrene, mitoxantrone, ametantrone, dihydromyristic acid, dihydromyristic acid-cedonate diacetate, and dactaribin on human cells *in vitro*. *Cancer Res* 1983;43:2648–53.
 - [17] Kapuscinski J, Dargatzisiewicz Z. Relationship between the pharmacological activity of antitumor drugs ametantrone and mitoxantrone (Novantrone) and their ability to condense nucleic acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:6302–6.
 - [18] Motley JD, Furlong PJ. Synthesis and calculated properties of some 1,4-bis(amino)anthracene-9,10-diones. *Org Biomol Chem* 2006;4:4005–14.
 - [19] Krapcho AP, Petry ME, Getahun Z, Landi Jr JJ, Stallman J, Folsenberg JF, Gallagher CE, Marech MJ, Hacker MP, Giuliani FC, Beggolini G, Pezzoni G, Menta E, Manzotti C, Oliva A, Spinelli S, Tognella S. 6,9-Bis(aminoalkyl)amino]benzo[g]isoquinoline-5,10-diones. A novel class of chromophore-modified antitumor anthracene-9,10-diones: synthesis and antitumor evaluations. *J Med Chem* 1994;37:428–37.
 - [20] Canal P, Arzal M, Chatelet E, Galichard S, Huguet F, Muller C, et al. Plasma and cellular pharmacokinetics of mitoxantrone in high-dose chemotherapeutic regimen for refractory lymphomas. *Cancer Res* 1993;53:4850–4.
 - [21] Hesseigasser J, Horuk R. Chemokine and chemokine receptor expression in the central nervous system. *J Neurovirol* 1999;5:13–26.
 - [22] Linton A, Kohler RE, Townley S, Haylock-Jacobs S, Cornford L, Cain AC, et al. Inhibition of CCR6 function reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis via effects on the priming phase of the immune response. *J Immunol* 2009;182:3121–30.
 - [23] Trapp BD, Bö L, Mollnes S, Chang A. Pathogenesis of tissue injury in MS lesions. *J Neuroimmunol* 1999;98:49–56.
 - [24] Komiyama Y, Nakae S, Matsuda T, Nambu A, Ichigame H, Kakuta S, et al. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2006;177:566–73.
 - [25] Steinman L. A brief history of Th17, the first major revision in the Th1/Th2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med* 2007;13:139–45.
 - [26] Lees JR, Golombok PF, Sim J, Dorsey D, Russell JH. Regional CNS responses to IFN- γ determine lesion localization patterns during EAE pathogenesis. *J Exp Med* 2008;205:2633–42.
 - [27] Murphy AC, Lalor SJ, Lynch MA, Mills SHG. Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Behav Immun* 2010;24:641–51.
 - [28] Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 2009;471:744–8.
 - [29] Murphy AC, Langrish CI, Chen Y, Blumenschein W, McClanahan T, Kastelein RA, et al. Divergent pro- and anti-inflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2003;196:1951–7.
 - [30] Zhang CX, Gran B, Yu S, Li J, Siglienti I, Chen X, et al. Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in IL-12 receptor beta 2-deficient mice: IL-12 responsiveness is not required in the pathogenesis of inflammatory demyelination in the central nervous system. *J Immunol* 2003;170:2153–60.
 - [31] Ferrari CE, Depino AM, Prada F, Marano N, Campbell S, Podhajcer O, et al. Resembling demyelination, blood-brain barrier breakdown, and pronounced neutrophil recruitment induced by chronic IL-1 expression in the brain. *Am J Pathol* 2004;165:1827–37.
 - [32] Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGF β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 2006;24:179–89.

ANEXO B – ARTIGOS SUBMETIDOS

Inhibiting AKT phosphorylation employing non-cytotoxic anthraquinones ameliorates TH2 and TH17-mediated allergic airways disease and rhinovirus exacerbation

Caio Cesar de Souza Alves, Adam Collison, Luke Hatchwell, Max Plank, Paul Foster, Sebastian Johnston, Cristiane França Costa, Mauro Vieira de Almeida, Ana Paula Ferreira, Joerg Mattes.

PlosONE – 2012

Synthesis and Evaluation of Cytotoxicity and Inhibitory Effect on Nitric Oxide Production by J774A.1 Macrophages of New Anthraquinone Derivatives

Caio Cesar S. Alves, Cristiane F. Da Costa, Sandra B. R. De Castro, Taís A. Corrêa, Gabriele O. Santiago, Renata Diniz, Ana Paula Ferreira, Mauro V. De Almeida

Medicinal Chemistry – 2012

ANEXO C – Carta Programa de Doutorando no Brasil com Estágio no Exterior – PDEE



*Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
Setor Bancário Norte, Quadra 2, Bloco L, Lote 06
70040-020 - Brasília, DF
Brasil*

A QUEM INTERESSAR POSSA

Declaramos, para os devidos fins, que o(a) interessado(a) abaixo, foi bolsista da Capes e realizou Estágio de doutorando no Exterior, por meio do Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior - PDEE.

BOLSISTA: CAIO CÉSAR DE SOUZA ALVES
PERÍODO DA BOLSA: 11/2010 a 10/2011
INSTITUIÇÃO: UNIVERSITY OF NEWCASTLE
PAÍS: AUSTRÁLIA
ÁREA: IMUNOLOGIA

Brasília, 21 de Dezembro de 2011

MARIA DE FÁTIMA BATTAGLIN
Coordenadora-Geral de Bolsas no Exterior