

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Alyria Teixeira Dias

**MODULAÇÃO DA GENISTEÍNA SOBRE OS RECEPTORES *TOLL*
LIKE E A IMUNIDADE ADAPTATIVA DURANTE O
DESENVOLVIMENTO DA ENCEFALOMIELITE AUTOIMUNE
EXPERIMENTAL**

JUIZ DE FORA

2016

ALYRIA TEIXEIRA DIAS

**MODULAÇÃO DA GENISTEÍNA SOBRE OS RECEPTORES *TOLL*
LIKE E A IMUNIDADE ADAPTATIVA DURANTE O
DESENVOLVIMENTO DA ENCEFALOMIELITE AUTOIMUNE
EXPERIMENTAL**

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

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Ferreira

JUIZ DE FORA

2016

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

Dias, Alyria Teixeira .

Modulação da genisteína sobre os receptores toll like e a imunidade adaptativa durante o desenvolvimento da encefalomielite autoimune experimental / Alyria Teixeira Dias. – 2016.

117 p. : il.

Orientador: Ana Paula Ferreira

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2016.

1. Esclerose múltipla. 2. Encefalomielite autoimune experimental. 3. Genisteína. 4. TLR. I. Ferreira, Ana Paula, orient. II. Título.

ALYRIA TEIXEIRA DIAS

**MODULAÇÃO DA GENISTEÍNA SOBRE OS RECEPTORES *TOLL*
LIKE E A IMUNIDADE ADAPTATIVA DURANTE O
DESENVOLVIMENTO DA ENCEFALOMIELITE AUTOIMUNE
EXPERIMENTAL**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas na área de Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, da Universidade Federal de Juiz de Fora, aprovada pela banca examinadora composta por:

Profa. Dra. Ana Paula Ferreira
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Maria Aparecida de Souza
Universidade Federal de Uberlândia

Dra. Wanessa Araújo Carvalho
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Prof. Dr. Jose Otavio do Amaral Correa
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Heloisa D'Avila da Silva Bizarro
Universidade Federal de Juiz de Fora

JUIZ DE FORA

___ / ___ / ___

Dedico este trabalho ao meu pai

“O filho que encontra no lar uma escola de amor e trabalho, de disciplina e compreensão, jamais esquecerá as lições ali aprendidas.

Além das palavras de orientação, é muito importante o exemplo da boa conduta. Por mais duros que sejam os embates da vida, ele saberá sempre escolher e trilhar os melhores caminhos, agradecendo aos pais, que souberam educá-lo com amor.”

AGRADECIMENTOS

Faltam palavras para expressar sentimentos, mas espero conseguir representar, pelo menos em parte, o carinho e o agradecimento a pessoas especiais na minha vida.

À minha família, por ser a base de tudo.

À querida Professora Ana Paula Ferreira, pelo voto de confiança, pelo incentivo e inestimável orientação, que possibilitou o meu crescimento científico.

À Sandra, Caio, Marcilene e Luan, pela ajuda e amizade.

Ao meu amor Bernardo, por tornar meus dias mais felizes.

À Fabiana e Rhaissa pela ajuda nos experimentos.

Aos pesquisadores Marco Antônio e Daniele da EMBRAPA, pela ajuda com a realização da técnica de RT-PCR.

Aos professores, amigos e funcionários do laboratório de Imunologia da UFJF.

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

Ao CNPq, CAPES, FAPEMIG e UFJF, pelo suporte financeiro.

A todos que de alguma forma tornaram este trabalho possível.

RESUMO

A esclerose múltipla (EM) e o seu modelo animal de estudo, a encefalomielite autoimune experimental (EAE), são caracterizadas por neuroinflamação imunomediada e desmielinização no sistema nervoso central (SNC). Os tratamentos para a EM normalmente incluem o interferon- β (IFN- β) e destinam-se a reduzir o número de surtos e retardar a progressão da doença. No entanto, são apenas parcialmente eficazes, sugerindo a necessidade do desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas. Os receptores *toll like* (TLRs) são receptores de reconhecimento de padrões do sistema imune inato e desempenham importante papel na iniciação de respostas inflamatórias e na indução da imunidade adaptativa. A sua participação na patogênese de doenças autoimunes têm sido estudada e foi também demonstrado que ligantes de TLRs podem suprimir a EAE. A genisteína é um fitoestrógeno obtido da soja com propriedades anti-inflamatórias. Alguns estudos mostraram seus efeitos benéficos na EAE e resultados promissores que sugerem potencial terapêutico na EM. Entretanto, os trabalhos realizados até o momento, utilizavam um protocolo de tratamento após o aparecimento dos sinais clínicos da doença e não abordavam a resposta imune inata. Neste contexto, o presente trabalho busca avaliar a modulação da resposta imune inata e a influência desta na resposta imune adaptativa, através dos TLRs, utilizando um tratamento com genisteína anterior ao aparecimento dos sinais clínicos da EAE, avaliando também os parâmetros no início do desenvolvimento da doença. Para isso, a EAE foi induzida em camundongos C57BL/6 fêmeas com o peptídeo MOG₃₅₋₅₅ tratados ou não com genisteína. O tratamento com 200mg/kg de massa corporal por dia, via subcutânea, foi realizado do período -2 dias antes da indução até o dia +6 após a indução da EAE. Os parâmetros laboratoriais foram avaliados na medula espinhal no 7º dia pós indução e os sinais clínicos acompanhados até o 21º dia pós indução. O tratamento com genisteína resultou em atraso no aparecimento e redução na pontuação dos sinais clínicos, concomitante à redução do infiltrado celular e da desmielinização da medula espinhal, reforçando seu potencial neuroprotetor em doenças autoimunes. Adicionalmente, foi observado aumento na intensidade mediana de fluorescência de TLR3 e TLR9 em macrófagos e células dendríticas e diminuição de TLR2 em células dendríticas, presentes na medula espinhal. A sinalização via TLR3 e TLR9 vêm sendo relacionada à maior produção de IFN- β em doenças autoimunes. De fato, o tratamento com genisteína aumentou a expressão relativa de RNAm para IFN- β na medula espinhal. Os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-12p40 e da quimiocina CCL5 foram reduzidos. Além disso, foi observado diminuição na expressão dos fatores de transcrição ROR γ T e T-bet e aumento na produção da citocina TGF- β , sugerindo o estabelecimento de um ambiente imuno regulador. Estes resultados reforçam o potencial terapêutico da genisteína no tratamento da EAE e da EM, sugerindo que o seu uso, inclusive na forma de suplementação ou alimentação rica em soja, poderia se aliar a terapias já estabelecidas, melhorando o quadro clínico da doença e prevenindo novos surtos.

Palavras chave: genisteína; esclerose múltipla; encefalomielite autoimune experimental; IFN- β ; TLR.

ABSTRACT

Multiple sclerosis (MS) and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), its animal model, are both characterized by immune-mediated neuroinflammation and demyelination in the central nervous system (CNS). The treatments for MS, including IFN- β , are intended to reduce the number of relapses and slow the progression of the disease. However, these treatments are only partially effective, suggesting the need to develop new therapies. The toll-like receptors (TLRs) are pattern-recognition receptors, of the innate immune system, that play important roles in the initiation of inflammatory responses and induction of adaptive immunity. Its role in the pathogenesis of autoimmune diseases have been demonstrated and it was also shown that TLR ligands can suppress EAE. Genistein is a phytoestrogen obtained from soybeans with anti-inflammatory properties. Some studies showed beneficial effects on EAE treatment, suggesting therapeutic potential in MS. However, the work done to date, used a treatment protocol after the onset of clinical signs of the disease and did not address the innate immune response. In this context, the present work aims to evaluate the modulation of innate immune response, and its influence in the adaptive immune response, through the TLRs, using a treatment protocol prior the onset of the clinical signs of the EAE, by evaluating the parameters in the beginning of the development of the disease. EAE was induced in C57BL/6 females with MOG35-55 peptide. The animals were treated or not with 200mg/kg/day of genistein, subcutaneously, in the period between 2 days before induction and until the day 6 after induction of EAE. Laboratory parameters were evaluated in the spinal cord in the day 7 after induction and clinical signs monitored until day 21 after induction. Treatment with genistein resulted in delayed onset and reduced score of disease, concomitant with reduced cellular infiltration and demyelination in the spinal cord, reinforcing its neuroprotective potential in autoimmune diseases. Additionally, it was observed an increase in the median fluorescence intensity of TLR3 and TLR9 in macrophages and dendritic cells and decrease of TLR2 in dendritic cells in the spinal cord. The signaling via TLR3 and TLR9 is related to increase the production of IFN- β . In fact, treatment with genistein increases mRNA expression for IFN- β in the spinal cord. The levels of IL-6, IL-12p40 and CCL5 were reduced. Furthermore, the expression of ROR- γ T and T-bet were decreased, and, together with increased production of TGF- β , suggest the development of a regulatory environment. These results heighten the therapeutic potential of genistein in the treatment of EAE and MS, suggesting that its use, including as a supplement or soy-enriched diet, could preventing new outbreaks.

Keywords: genistein; multiple sclerosis; experimental autoimmune encephalomyelitis; IFN- β ; TLR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Fatores dietéticos, microbiota intestinal e inflamação.	22
Figura 2 Principais sintomas da esclerose múltipla	23
Figura 3 Padrões clínicos da EM	24
Figura 4 Diferenciação de células T <i>helper</i> ,	26
Figura 5 Migração e função de células T efetoras durante a EAE . . .	34
Figura 6 Estrutura molecular do β -estradiol e da genisteína	40
Figura 7 Escore clínico e massa corporal dos camundongos (n=8 animais por grupo) imunizados com peptídeo MOG ₃₅₋₅₅ tratados ou não com genisteína	55
Figura 8 Infiltrado inflamatório. Análise histológica através da coloração de hematoxilina e eosina de cortes transversais de medula espinhal de camundongos C57BL/6 imunizados tratados ou não com genisteína	57
Figura 9 Escore de inflamação. Análise histológica nos dias 7, 14 e 21 pós indução, através da coloração de hematoxilina e eosina de cortes transversais de medula espinhal de camundongos C57BL/6 imunizados tratados ou não com genisteína	58
Figura 10 Desmielinização. Análise histológica através da coloração de <i>luxol fast blue</i> de cortes transversais de medula espinhal de camundongos C57BL/6 imunizados tratados ou não com genisteína .	60
Figura 11 Escore de desmielinização. Análise histológica através da coloração de <i>luxol fast blue</i> de cortes transversais de medula espinhal de camundongos C57BL/6 imunizados tratados ou não com genisteína	61
Figura 12 Intensidade mediana de fluorescência de TLR2, TLR3, TLR4 e TLR9 determinada em células da medula espinhal por citometria de fluxo no 7º dia pós indução	63

Figura 13 Expressão relativa de RNAm de IFN- β determinada em células da medula espinhal por qRT-PCR no 7º dia pós indução	64
Figura 14 Concentração das quimiocinas CCL5 e CCL20 determinada no homogenato da medula espinhal por ELISA no 7º dia pós indução	65
Figura 15 Concentração das citocinas IL-12p40, IFN- γ , IL-17A, IL-6, TGF- β e IL-10 determinada no homogenato da medula espinhal por ELISA no 7º dia pós indução	67
Figura 16 Expressão relativa de RNAm de T-bet e ROR γ T determinada em células da medula espinhal por qRT-PCR no 7º dia pós indução	68
Figura 17 Intensidade mediana de fluorescência de Foxp3 e IL-10 determinada em células da medula espinhal por citometria de fluxo no 7º dia pós indução	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Modelos clássicos de EAE	32
Tabela 2 Distribuição dos animais em grupos	46
Tabela 3 Escala neurológica clínica para avaliar a EAE	47
Tabela 4 Sequência dos oligonucleotídeos, temperatura de anelamento e número de pares de base	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCs	Células apresentadoras de antígenos
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CFA	Adjuvante completo de Freund
CTLA-4	Antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico
DCs	Células dendríticas
DMSO	Dimetilsulfóxido
d.p.i.	Dia pós-indução
EDSS	Escala Expandida do Estado de Incapacidade de Kurtzke
ELISA	Enzima imunoensaio
ER α	Receptor de estrogênio α
ER β	Receptor de estrogênio β
Foxp3	<i>Forkhead Box P3</i>
HE	Hematoxilina-eosina
HLA	Antígeno leucocitário humano
IL	Interleucina
i.p.	Intraperitoneal
LFB	<i>Luxol fast blue</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
mg	Miligrama
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade

MOG	Glicoproteína Mielínica de Oligodendrócitos
PBS	Salina tamponada com fosfato
PBM	Proteína Básica da Mielina
PLP	Proteína Proteolípídica da Mielina
qRT-PCR	Reação da cadeia da polimerase em tempo real
RR	Remitente-recorrente
s.c.	Subcutânea
TGF- β	Fator de transformação do crescimento do tipo β
Th	Linfócito T <i>helper</i>
TLR	Receptores <i>toll like</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
Treg	Célula T reguladora
VCAM-1	Molécula de adesão vascular 1
VLA-4	Proteína 4 de ativação tardia (integrina)
μg	micrograma
μL	microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 ESCLEROSE MÚLTIPLA	18
2.2 A ENCEFALOMIELITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL (EAE)	31
2.3 EFEITO NEUROPROTETOR DOS ESTRÓGENOS	36
2.4 GENISTEÍNA	39
3 OBJETIVOS	43
3.1 OBJETIVO GERAL	43
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
4 MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1 ANIMAIS	44
4.2 PROTEÍNA MIELODENDRÍTICA	44
4.3 INDUÇÃO DO MODELO DE EAE	44
4.4 TRATAMENTO COM GENISTEÍNA	45
4.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	45
4.6 AVALIAÇÃO DO CURSO CLÍNICO	46
4.7 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DOS ÓRGÃOS E CÉLULAS	47
4.8 RT-PCR EM TEMPO REAL E ANÁLISE DE PCR QUANTITATIVA PARA ROR γ T, T-BET E IFN- β	48
4.9 ISOLAMENTO E PREPARAÇÃO DE CÉLULAS	

MONONUCLEARES DA MEDULA ESPINHAL	50
4.10 AVALIAÇÃO DE MARCADORES CELULARES POR CITOMETRIA DE FLUXO	50
4.11 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS POR ELISA	51
4.12 COLORAÇÃO POR HEMATOXILINA-EOSINA	51
4.13 COLORAÇÃO POR LUXOL FAST BLUE	52
4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
5 RESULTADOS	54
5.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA GENISTEÍNA NO CURSO CLÍNICO E NA MASSA CORPORAL DOS ANIMAIS COM EAE ..	54
5.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA GENISTEÍNA NO INFILTRADO INFLAMATÓRIO NA MEDULA ESPINHAL DOS ANIMAIS COM EAE	56
5.3 ESCORE DE INFLAMAÇÃO NA MEDULA ESPINHAL	58
5.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA GENISTEÍNA NA DESMIELINIZAÇÃO DA MEDULA ESPINHAL DOS ANIMAIS COM EAE	59
5.5 ESCORE DE DESMIELINIZAÇÃO DA MEDULA ESPINHAL	61
5.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA GENISTEÍNA NA INTENSIDADE MEDIANA DE FLUORESCÊNCIA DE TLR2, TLR3, TLR4 E TLR9 EM CÉLULAS DA MEDULA ESPINHAL POR CITOMETRIA DE FLUXO NO 7º DIA PÓS INDUÇÃO	62
5.7 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA GENISTEÍNA NA EXPRESSÃO RELATIVA DE IFN- β EM CÉLULAS DA MEDULA ESPINHAL POR QRT-PCR NO 7º DIA PÓS INDUÇÃO	64
5.8 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA GENISTEÍNA NA CONCENTRAÇÃO DAS QUIMIOCINAS CCL5 E CCL20 NO HOMOGENATO DA MEDULA ESPINHAL POR ELISA NO 7º DIA	

PÓS INDUÇÃO	65
5.9 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA GENISTEÍNA NA CONCENTRAÇÃO DAS CITOCINAS IL-12p40, IFN- γ , IL-17A, IL- 6, TGF- β E IL-10 NO HOMOGENATO DA MEDULA ESPINHAL POR ELISA NO 7º DIA PÓS INDUÇÃO	66
5.10 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA GENISTEÍNA NA EXPRESSÃO RELATIVA DE RNAM DE T-BET E ROR γ T EM CÉLULAS DA MEDULA ESPINHAL POR QRT-PCR NO 7º DIA PÓS INDUÇÃO	68
5.11 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA GENISTEÍNA NA INTENSIDADE MEDIANA DE FLUORESCÊNCIA DE FOXP3 E IL- 10 EM CÉLULAS DA MEDULA ESPINHAL POR CITOMETRIA DE FLUXO NO 7º DIA PÓS INDUÇÃO	69
6 DISCUSSÃO	70
7 CONCLUSÃO	82
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

1 INTRODUÇÃO

A esclerose múltipla (EM) é uma doença inflamatória crônica, desmielinizante, que resulta em distúrbios neurodegenerativos no sistema nervoso central (SNC). Ela afeta adultos jovens, sendo mais frequente no sexo feminino e constitui importante causa de incapacidade neurológica não traumática (KOCH-HENRIKSEN e SØRENSEN, 2010). É considerada uma doença imuno-mediada complexa e sua etiologia, provavelmente, decorre de uma interação entre fatores genéticos e ambientais (revisto por PANTAZOU, SCHLUEP e DU PASQUIER, 2015).

Atualmente, os tratamentos disponíveis para a EM destinam-se, principalmente, a reduzir o número de surtos e retardar sua progressão. As terapias imunomoduladoras utilizadas, normalmente, incluem o interferon- β (IFN- β), porém estes tratamentos são apenas parcialmente eficazes e cerca de um terço dos pacientes com EM continuará a apresentar surtos e apresentará progressão da incapacidade (BUSTAMANTE et al., 2015; KATSARAVA et al., 2015), sugerindo a necessidade do desenvolvimento de alternativas terapêuticas mais eficientes (TSAREVA et al., 2016).

A encefalomielite autoimune experimental (EAE) é o modelo animal de estudo da EM mais utilizado, traduzindo-se como um método de valor inestimável para estudar a doença humana, pois diferentes modelos de EAE são capazes de reproduzir diferentes aspectos da EM (MIX et al., 2010; CROXFORD, KURSCHUS e WAISMAN, 2011). É normalmente induzida pela imunização de animais experimentais com componentes da mielina do SNC, na presença de um adjuvante (BAXTER, 2007), sendo capaz de promover a resposta de células T autorreativas patogênicas (BAKER e AMOR, 2014).

Resultados de estudos genéticos e histopatológicos em pacientes com EM têm mostrado que o sistema imunológico desempenha um papel fundamental na doença (PENDER e GREER, 2007; LEHMANN, ROTTLAENDER e KUERTEN, 2015), enquanto dados de estudos imunológicos no modelo de EAE, têm ajudado a melhorar a compreensão do envolvimento da imunidade inata e da adaptativa na

EM, permitindo melhor aprimoramento das estratégias terapêuticas (HEMMER, KERSCHENSTEINER e KORN, 2015).

Diante da ineficácia dos tratamentos existentes, o desenvolvimento de terapias neuroprotetoras têm despertado considerável interesse em muitos grupos de estudo. Os estrógenos e os agonistas de seus receptores podem modular a ativação de muitos tipos diferentes de células do sistema imunológico (STRAUB, 2007) e do sistema nervoso central (SPENCER et al., 2008; DUMITRIU et al., 2010). Estudos mostraram que os estrógenos podem suprimir a ativação da micróglia e recrutar os monócitos derivados do sangue para o cérebro de ratos, após a injeção intracerebroventricular de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) (VEGETO et al., 2003). Podem também inibir a expressão de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β e TNF- α em astrócitos, após a exposição a LPS (LEWIS et al., 2008).

Dependendo dos mecanismos de sinalização, estes compostos podem desempenhar um papel duplo, atenuando a neuroinflamação e também a neurodegeneração, por inibir a ativação da micróglia e dos astrócitos. Alguns trabalhos atribuíram aos estrógenos a capacidade de prevenir a neurodegeneração induzida pela EM, devido à presença de seus receptores no SNC e nas células do sistema imunológico (MACKENZIE-GRAHAM et al., 2012; RAGERDI KASHAN et al., 2012; CHRISTIANSON, MENSAH e SHEN, 2015). Além disso, a administração do 17 β -estradiol foi capaz de reduzir a gravidade da EAE, pois diminuiu a patologia neuronal e preservou a mielina, sugerindo o potencial desses compostos no tratamento da EM (TIWARI-WOODRUFF e VOSKUHL, 2009).

Apesar de parecer viável a utilização dos estrógenos em pacientes com EM, estudos têm demonstrado que o seu uso pode ter efeitos secundários graves. A genisteína é um fitoestrógeno que compartilha características estruturais com o 17 β -estradiol e apresenta a capacidade de se ligar em seus receptores (COOKE, SELVARAJ e YELLAYI, 2006; SIROTKIN e HARRATH, 2014; GANAI e FAROOQI, 2015). Desta forma, os fitoestrógenos obtidos da soja tal como a genisteína, foram propostos como uma alternativa à terapia estrogênica (SIROTKIN e HARRATH, 2014).

O potencial imunomodulador da genisteína é reforçado por dados que mostram que o consumo de alimentos ricos em soja, tem sido correlacionado à reduzida prevalência de várias doenças crônicas, tal como a EM (THAM, GARDNER

e HASKELL, 1998; ROTONDO et al., 2008; ZAHEER e HUMAYOUN AKHTAR, 2015). Outros estudos avaliaram os efeitos sobre a EAE e mostraram que o tratamento com genisteína (De PAULA et al., 2008) ou o seu análogo (CASTRO et al., 2012) reduziu a gravidade da doença, sendo que esta isoflavona foi capaz de reduzir citocinas pró-inflamatórias, aumentar células reguladoras e reduzir a aderência e o rolamento de leucócitos no endotélio do SNC (De PAULA et al., 2008; CASTRO et al., 2012; RAZEGHI JAHROMI et al., 2014).

Entretanto, esses estudos trabalhavam com protocolos de tratamento após o aparecimento dos sinais clínicos da doença, diferente do que propomos agora e não abordavam a influência sobre o sistema imune inato. Os receptores do tipo *toll* são uma família de proteínas transmembrânicas do tipo I e responsáveis pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Desempenham um importante elo entre as respostas imune inata e adaptativa e muitos trabalhos vêm mostrando que a sinalização via TLRs pode contribuir para o agravamento ou a redução dos sinais clínicos da EAE e da EM (BSIBSI et al., 2002; TOUIL et al., 2006).

Desta forma, o presente estudo busca compreender a modulação da genisteína sobre os TLRs e a influência destes na resposta imune adaptativa, utilizando um tratamento anterior ao aparecimento dos sinais clínicos da EAE e avaliando parâmetros no início do desenvolvimento da doença, tais como sinais clínicos, alterações na massa corporal, expressão de TLRs, produção de citocinas e quimiocinas, expressão de fatores de transcrição, infiltrado inflamatório e desmielinização.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ESCLEROSE MÚLTIPLA

A esclerose múltipla é uma doença autoimune inflamatória crônica, mediada por células imunológicas autorreativas contra a bainha de mielina presente nos axônios dos neurônios, caracterizada por desmielinização, formação de placas e disfunção do SNC, resultando em déficits nas propriedades condutoras e afetando também a sinalização elétrica (LASSMANN, BRÜCK e LUCCHINETTI, 2007; COMPSTON e COLES, 2008). A placa inflamatória pode ser determinada histopatologicamente ou usando ressonância magnética e constitui a principal característica patológica da EM (FROHMAN, RACKE e RAINE, 2006).

No mundo, mais de 2 milhões de pessoas têm EM e a incidência continua aumentando. Os resultados publicados no Atlas da esclerose múltipla (2013) revelaram que o número estimado de pessoas que vivem com a doença no mundo aumentou 9,5%, de 2,1 milhões em 2008 para 2,3 milhões em 2013. A prevalência média mundial aumentou de 30 (em 2008) para 33 por 100.000 (em 2013), sendo maior na América do Norte e Europa (140 e 108 por 100.000, respectivamente) e menor na África Subsaariana e na Ásia Oriental (2,1 e 2,2 por 100.000, respectivamente).

Diversos fatores influenciam as estatísticas de prevalência da EM, incluindo a precisão do diagnóstico e o nível de serviços médicos de cada país. Este último também é responsável por outro componente importante da prevalência, o tempo de sobrevivência do paciente (KOCH-HENRIKSEN e SØRENSEN, 2010). Fatores como estilo de vida, tipo de alimentação, exposição solar e infecções helmínticas e bacterianas têm sido utilizados para explicar as diferenças de prevalência nas diversas partes do mundo (BERER et al., 2011; CORREALE e FAREZ, 2011; BELKAID e HAND, 2014; PANTAZOU, SCHLUEP e DU PASQUIER, 2015).

A doença geralmente começa entre as idades de 20 e 40 anos e se tornou a principal causa de incapacidade não traumática em adultos jovens. Os sintomas iniciais raramente ocorrem antes da idade de 10 anos ou após a idade de 60 anos.

As mulheres são mais afetadas do que os homens, exceto em indivíduos com a forma primária progressiva da doença, em que não há nenhuma preponderância de gênero (CONFAVREUX e VUKUSIC, 2006; NATIONAL MULTIPLE SCLEROSIS SOCIETY, 2012). A etiologia da EM permanece desconhecida. Provavelmente, decorre de complexas interações entre fatores ambientais e genéticos.

Entre os marcadores genéticos específicos relacionados ao desenvolvimento da EM está a presença de genes ligados aos alelos do antígeno leucocitário humano (HLA) do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II (GOURRAUD et al., 2012). A EM não seria causada pelo defeito de um único gene, mas sim pelo efeito de vários genes que contribuiriam para o risco da doença. Os alelos HLA de classe II DRB1*1501, DRB1*0301 e DRB1*1303, expressos em células do sistema imune inato foram associados a um risco maior de desenvolvimento da EM, enquanto o alelo HLA de classe I A2 está associado a um risco menor (INTERNATIONAL MULTIPLE SCLEROSIS GENETICS CONSORTIUM et al., 2011).

Outra evidência da influência da predisposição genética diz respeito ao fato de parentes de primeiro grau dos pacientes com EM apresentarem chance 20 a 40 vezes maior de desenvolverem a doença. Além disso, existe concordância de 25% a 30% entre gêmeos monozigóticos, em comparação com apenas 5% entre gêmeos dizigóticos. Apesar dessas evidências, aproximadamente 70% dos gêmeos idênticos são discordantes para a EM, por isso, os fatores ambientais e outras influências desconhecidas, provavelmente também contribuem para a suscetibilidade (revisito por LASSMANN, BRÜCK e LUCCHINETTI, 2007).

Entre os fatores ambientais desencadeantes do desenvolvimento de doenças autoimunes, a presença de micro-organismos parece ser importante para o início e a progressão da doença. A hipótese do mimetismo molecular postula que antígenos de micro-organismos originados de infecções, estruturalmente relacionados com antígenos do SNC, tal como a proteína básica da mielina, ativariam as células T. Desta forma, um TCR seria capaz de reconhecer mais de um peptídeo e levar ao reconhecimento de autoantígenos (MUNZ et al., 2009; STEELMAN, 2015).

Por outro lado, a hipótese da ativação espectadora estabelece que a presença de infecções teciduais e inflamações podem recrutar células T para o local,

podendo ocorrer ativação de células apresentadoras de antígenos (APCs) e expressão de moléculas co-estimuladoras, o que pode resultar na ativação de células inespecíficas para o patógeno, tal como as células T autorreativas (SERAFINI et al., 2007; MUNZ et al., 2009; STEELMAN, 2015).

A microbiota também desempenha papel fundamental na indução, formação e função do sistema imunológico do hospedeiro, que evoluiu de forma a manter uma relação simbiótica e em constante evolução com estes micro-organismos. O equilíbrio sistema imunológico-microbiota permite a indução de respostas protetoras a agentes patogênicos e a manutenção de vias reguladoras envolvidas na tolerância a antígenos inócuos (HARTUNG et al., 2014).

No entanto, em países de alta renda, o uso excessivo de antibióticos, mudanças na dieta e a eliminação de infecções helmínticas selecionou uma microbiota que pode não ter a diversidade necessária para estabelecer respostas imunológicas equilibradas. Este fenômeno foi proposto para explicar o aumento de doenças autoimunes e inflamatórias em partes do mundo onde a relação simbiótica homem-microbiota tem sido mais afetada (BELKAID e HAND, 2014; revisto por ALLEN, 2016).

A relação entre a microbiota intestinal e as respostas imunológicas sistêmicas tem motivado estudos sobre a patogênese de doenças imuno-mediadas. Investigações realizadas em modelos experimentais de EM têm demonstrado que alterações da microbiota intestinal é um fator de risco potencial para o seu desenvolvimento e estão de acordo com o observado em estudos anteriores que mostraram variação na patogênese desta doença em animais geneticamente idênticos alojados em diferentes condições ambientais (BERER et al., 2011.; LEE et al., 2011).

Um modelo experimental de estudo da EM mostrou que a administração de antibióticos por via oral alterou a microbiota intestinal e reduziu a gravidade da doença (YOKOTE et al., 2008). Outros estudos mostraram que a ativação de células B específicas para a mielina e a invasão do SNC por células T efetoras são influenciadas pela microbiota comensal (BERER et al., 2011.; OCHOA-REPARAZ et al., 2010). Portanto, o papel dos micro-organismos na indução da doença é contextual, podendo ser protetor e capaz de melhorar os sintomas via indução de

células T reguladoras ou mesmo atuando como gatilho para o desencadeamento da doença (LEE et al., 2011).

Durante as últimas décadas, o aumento constante na incidência de doenças autoimunes em países desenvolvidos chamou atenção para a influência das infecções helmínticas sobre a autoimunidade (CORREALE e FAREZ, 2011). Foi demonstrado que infecções parasitárias podem alterar o curso da EM (CORREALE e FAREZ, 2007). Pacientes com EM infectados com helmintos apresentaram menor número de recaídas e mínima progressão na manifestação dos sinais clínicos, em comparação com indivíduos não infectados. As infecções helmínticas resultaram no desenvolvimento de células T reguladoras, e ao mesmo tempo inibição da proliferação de células autorreativas (CORREALE, FAREZ e RAZZITTE, 2008).

Vários estudos têm avaliado também o efeito de hábitos alimentares, estilo de vida, infecções virais, ingestão de vitaminas, exposição ao sol, uso de cigarro e obesidade sobre a prevalência da EM (revisão por PANTAZOU, SCHLUEP e DU PASQUIER, 2015). O conhecimento desses fatores de risco pode contribuir para abordagens preventivas do desenvolvimento da doença (LERAY et al., 2016). Atualmente, a infecção prévia pelo vírus Epstein Barr, especialmente quando ocorre no final da infância, e a deficiência de vitamina D, são os fatores ambientais mais amplamente associados ao risco de desenvolvimento da EM (MANDIA et al., 2014; MÜNZ et al., 2009). Além disso, o hábito de fumar também tem sido considerado importante (HEDSTRÖM, OLSSON e ALFREDSSON, 2015).

Alguns trabalhos vêm demonstrando que o estilo de dieta ocidental, caracterizada por elevado teor de sal, gordura animal, carne vermelha, bebidas adoçadas com açúcar, frituras, pobre em fibras e falta de exercício físico regula positivamente o metabolismo das células humanas em relação biossintética, incluindo as vias de moléculas pró-inflamatórias e também leva a uma microbiota intestinal disbiótica (patogênica), alteração da imunidade intestinal e inflamação sistêmica de baixo grau (RICCIO, ROSSANO e LIUZZI, 2010; RICCIO e ROSSANO, 2015).

Por outro lado, exercícios e dietas de baixa caloria baseados na ingestão de legumes, frutas, peixes, prebióticos e probióticos, agem sobre os receptores nucleares e enzimas que regulam positivamente o metabolismo oxidativo, regulando negativamente a síntese de moléculas pró-inflamatórias e restaurando ou mantendo

uma microbiota simbiótica (saudável) no intestino, como pode ser observado na figura 1 (RICCIO e ROSSANO, 2015). Portanto, é provável que as pessoas que são geneticamente predispostas à autoimunidade, apresentem hábitos alimentares calóricos e possuam comunidades microbianas disbióticas apresentem maiores chances de desenvolver a doença (VIEIRA, PAGOVIK e KRIEGEL, 2014; MIELCARZ e KASPER, 2015).

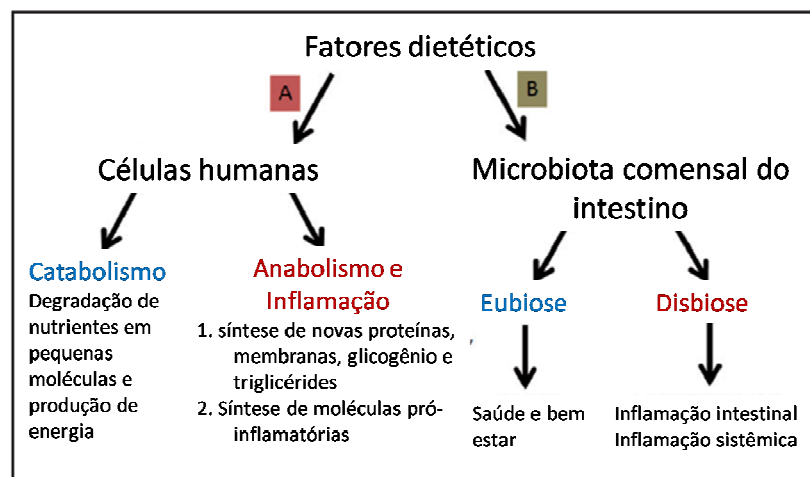


Figura 1: Fatores dietéticos, microbiota intestinal e inflamação (Adaptado: RICCIO e ROSSANO, 2015).

A EM é considerada uma doença heterogênea, pois as lesões são multifocais e os sinais neurológicos são dependentes da sua extensão e localização, resultando em ampla variedade de sintomas clínicos como mostrado na figura 2. As lesões geralmente estão localizadas na substância branca, ao redor dos ventrículos, nervo óptico, corpo caloso, cerebelo, medula espinal, tronco cerebral e em regiões subcortical da substância cinzenta. Os sintomas podem incluir distúrbios visuais, fraqueza muscular, dificuldades de coordenação e equilíbrio, dormência ou formigamento, problemas de memória, ou alterações na função do intestino e da bexiga (revisto por MILO e MILLER, 2014).

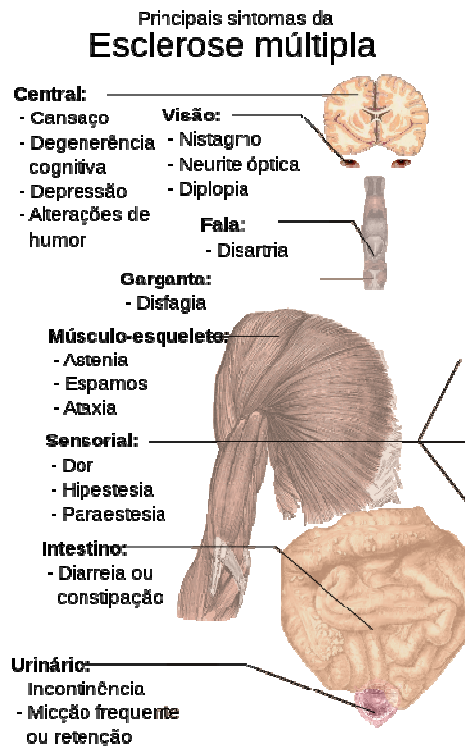


Figura 2: Principais sintomas da esclerose múltipla (Adaptado: MEDICAL GALLERY OF MIKAEL HÄGGSTRÖM, 2014).

A doença manifesta-se por uma série de surtos, caracterizados por uma exacerbação dos sinais clínicos, resultantes de um evento inflamatório agudo desmielinizante no SNC (POLMAN et al., 2011). A Escala Expandida do Estado de Incapacidade de Kurtzke (EDSS) é o principal método utilizado para quantificar as incapacidades ocorridas durante a evolução clínica da EM ao longo do tempo (KURTZKE, 1983). A figura 3 apresenta as quatro formas clínicas da EM no gráfico obtido pela medida de escore segundo a escala EDSS, demonstrando as consequências na progressão da doença após os surtos e caracterizando as formas clínicas, sendo que a inclinação do gráfico para a direita indica a piora do escore e os picos representam a manifestação dos surtos ou recaídas (LUBLIN, 2007).

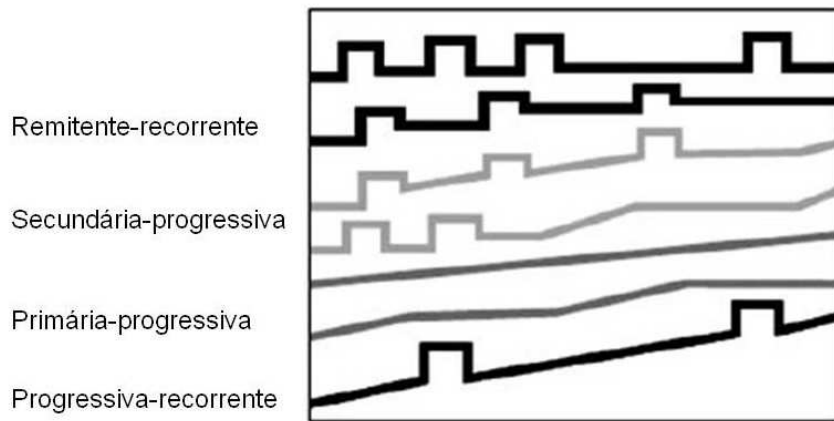


Figura 3: Padrões clínicos da EM (Adaptado: LUBLIN, 2007).

A forma remitente-recorrente, na qual os pacientes sofrem exacerbações temporárias de disfunção do SNC, intercaladas com períodos assintomáticos. A forma secundária progressiva, quando os pacientes não conseguem se recuperar totalmente das recaídas e apresentam incapacidade progressiva. A primária progressiva, na qual os pacientes sofrem uma constante progressão da deficiência, sem períodos de recaída distintos. A forma progressiva-recorrente, quando os pacientes sofrem constantemente avanço da deficiência, além de períodos de recaídas identificáveis (LUBLIN e REINGOLD, 1996).

Os cursos do tipo remitente-recorrente são os mais comuns (80-85%) e o mais suscetível ao tratamento com medicamentos. Na fase remitente-recorrente, a doença clínica parece ocorrer em função de novas lesões inflamatórias, desmielinizantes, no SNC. O acúmulo de sintomas neurológicos irreversíveis, portanto, em grande parte depende do número e gravidade dos surtos e da localização dessas lesões (CONFAVREUX et al., 2000). No entanto, após vários anos de doença, quando os pacientes alcançaram um limiar de sintomas neurológicos irreversíveis e quando a compensação funcional parece ter se esgotado, as características clínicas da doença mudam, anunciando o início da fase secundária-progressiva (LERAY et al., 2010).

Na EM o infiltrado inflamatório é composto principalmente por linfócitos T autorreativos, macrófagos, microglia, células ependimais, astrócitos e mastócitos, que têm a capacidade de entrar no SNC e incitar uma resposta pró-inflamatória, resultando em lesão tecidual local (PITTOCK e LUCCHINETTI, 2007). A grande maioria dos linfócitos são células T CD8⁺ restritas ao MHC de classe I, que também

apresentam expansão clonal dominante nas lesões (BABBE et al., 2000, GALEA et al., 2007). Células T CD4⁺ restritas ao MHC de classe II, bem como as células B, são principalmente encontradas em espaços perivasculares e nas meninges, ao passo que o infiltrado no tecido compacto do SNC é escasso. (LOPES PINHEIRO et al., 2016; MICHEL et al., 2015).

Existem evidências do papel patogênico e/ou regulador das células T CD8⁺ na EM. Elas superam as células T CD4⁺ em lesões da EM (BABBE et al., 2000); apresentam expansão oligoclonal no SNC dos pacientes, o que indica um papel ativo no local da patologia (BABBE et al., 2000); pacientes com EM têm alta prevalência de respostas de células T CD8⁺ específicas para neuroantígenos na sua circulação (CRAWFORD et al., 2004) e estas células parecem ter fenótipos funcionais mistos, em que expressam moléculas efetoras citotóxicas e reguladoras (CRAWFORD et al., 2004).

O limitado acesso ao SNC dificulta a compreensão dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da EM e a maioria dos estudos concentra-se na avaliação do líquido cefalorraquidiano (LCR) na tentativa de compreender os processos que envolvem as células T *in situ*. Em 2007, foram observadas células T CD8⁺ efetoras no LCR de 52 pacientes com EM remitente-recorrente no início da doença (JILEK et al., 2007). Posteriormente, células T CD8⁺ que expressam granzima B, foram observadas em pacientes com a forma remitente-recorrente (IFERGAN et al., 2011).

Em um modelo de migração *in vitro*, simulando a barreira hemato-encefálica, foi observado aumento da migração de células T CD8⁺, especialmente aquelas que produziam granzima B, perforina, interferon- γ (IFN- γ) e IL-17 (IFERGAN et al., 2011). Outro estudo mostrou que as granzimas A e B apresentaram maiores níveis no LCR de pacientes em surtos, quando comparados com pacientes em remissão ou controles saudáveis (MALMESTRÖM et al., 2008).

Alguns estudos mostraram também outro fenótipo de células T CD8⁺ com potencial regulador, que expressam CD25 e *forkhead box P3* (Foxp3) e detectadas em pacientes com EM (CORREALE e VILLA, 2010). Estas células inibem a proliferação de células T CD4⁺ e a produção de interleucina-17 (IL-17), além de regular negativamente a expressão de moléculas co-estimuladoras em células dendríticas (SINHA, ITANI e KARANDIKAR, 2014).

Citocinas pró-inflamatórias provenientes de células T diferenciadas estão associadas às condições neuroinflamatórias. Células T *helper* 1 (Th1), que secretam citocinas pró-inflamatórias, tais como o IFN- γ e células T *helper* 17 (Th17), secretoras de IL-17, mobilizam as células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos na periferia e microglia no SNC) e são responsáveis pelo ataque inflamatório ao antígeno mielina (KARNI et al., 2002; LOPES PINHEIRO et al., 2016). A diferenciação dessas células T é influenciada pelo microambiente de citocinas e pela participação de fatores de transcrição, tal como pode ser observado na figura 4 (LAZAREVIC e GLIMCHER, 2011).

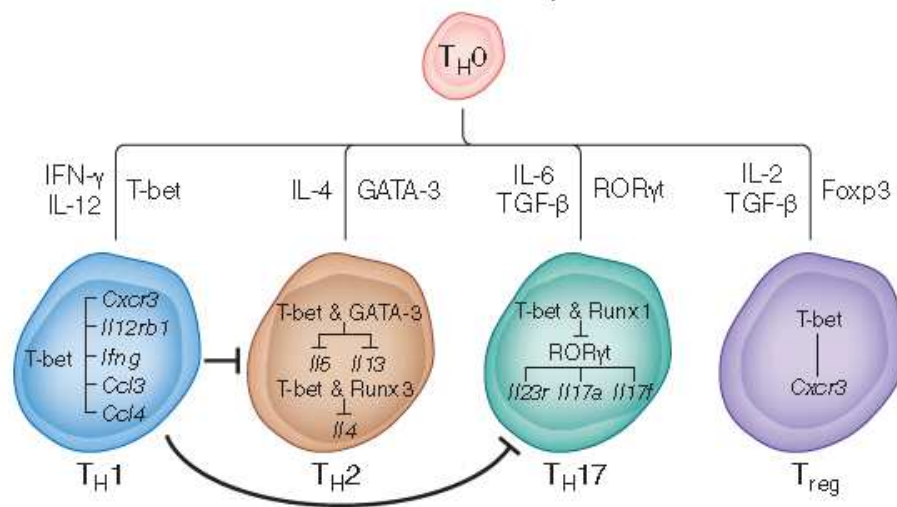


Figura 4: Diferenciação de células T *helper* (Adaptado: LAZAREVIC e GLIMCHER, 2011).

Quando as células T CD4⁺ *naive* (Th0) são ativadas na presença de IFN- γ e IL-12, elas se diferenciam no subconjunto Th1. A diferenciação de células Th1 é dependente do fator de transcrição T-bet (SCHULZ et al., 2009), enquanto a diferenciação de T CD4⁺ em células Th17 é induzida pelo fator de transcrição ROR γ t (IVANOV et al., 2006). Além disso, a citocina TGF- β , na presença de IL-6, é necessária para a diferenciação das células Th17 (WEAVER et al., 2006).

Células T *helper* produtoras de IL-17 são consideradas a principal população de células T patogênicas responsáveis pelo desenvolvimento de doenças autoimunes e a extensão do envolvimento de células Th17 pode ser um determinante da gravidade da EM, sendo que a doença mais grave parece ser conduzida pela citocina IL-17 e a doença menos grave pelo IFN- γ (STROMNES et al., 2008). Desta forma, medicamentos que inibem a ativação de células Th1 e/ou

Th17 têm sido utilizados no tratamento de doenças autoimunes (PUTHETI et al., 2003).

A citocina TGF- β , por si só, conduz a expressão do fator de transcrição Foxp3 induzindo a diferenciação de células T *naïve* em células T reguladoras (Treg) que também são ativadas por células apresentadoras de antígenos, liberam citocinas anti-inflamatórias, tais como a IL-10 e o TGF- β , que inibem a cascata inflamatória iniciada pelas células Th1 e Th17 (BETTELLI et al., 2006; JOSEFOWICZ, LU e RUDENSKY, 2012). Portanto, tratamentos que promovem a ativação e/ou a proliferação de células Treg podem contribuir na terapêutica de doenças autoimunes (VIGLIETTA et al., 2004; ELISEEVA et al., 2012).

Citocinas relacionadas com a resposta Th2, tais como IL-4, IL-10 e IL-5 têm sido associadas com a redução da inflamação e melhora dos sintomas em pacientes com EM (OREJA-GUEVARA et al., 2012). Correale e Farez (2007) observaram que pacientes com EM infectados por helmintos apresentavam menor número de recaídas da doença autoimune e redução na pontuação da escala EDSS, sendo o mecanismo imunológico dessa proteção atribuído à resposta imune Th2 antiparasitária.

Por muitos anos o estudo da autoimunidade centrou-se quase inteiramente na resposta das células T descrita anteriormente. Nesse contexto, a EM é reconhecida como uma doença mediada pelo sistema imune adaptativo, no qual as células T que reconhecem especificamente fragmentos de mielina induzem danos no tecido e contribuem para a evolução da lesão (PENDER e GREER, 2007). No entanto, a descoberta de que certas moléculas bacterianas podem provocar uma resposta imune inata e uma subsequente resposta imune adaptativa chamou a atenção para o papel do sistema imune inato durante o início das respostas das células T CD4⁺ na EM (HERNÁNDEZ-PEDRO et al., 2013).

Foi demonstrado que o sistema imune inato, responsável por respostas imunológicas que não são antígeno-específicas, desempenha papel importante no início e em estágios avançados da EM, ativando a função efetora de células T e B de forma semelhante ao processo no qual um agente patogênico está envolvido (WEINER, 2008; GANDHI, LARONI e WEINER, 2010). As infecções por patógenos, como vírus, bactérias ou parasitas são capazes de promover o desenvolvimento de doenças autoimunes em indivíduos suscetíveis, porque frequentemente induzem

fortes respostas inflamatórias sistêmicas. Possivelmente, o ambiente inflamatório resultante ativaria APCs que apresentariam também antígenos próprios para as células autorreativas (GABY, 2013; STEELMAN, 2015).

Além disso, existem várias vias através das quais os vírus e outros patógenos podem iniciar ou modular a autoimunidade de forma antígeno-específica ou não antígeno-específica (CHRISTEN e VON HERRATH, 2004). A capacidade do hospedeiro para se defender contra patógenos invasores pode ser mediada por um grupo de receptores conhecidos como receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). Entre estas moléculas estão os receptores *toll-like* que são capazes de reconhecer um grande número de padrões moleculares presentes em bactérias, vírus e fungos (revisto por ISHII et al., 2008).

Os TLRs são uma família de receptores localizados na superfície da célula ou em endossomas de vários tipos celulares. A ativação através de TLRs ocorre principalmente em macrófagos e outras APCs, tais como células dendríticas e células B (DORNER et al., 2009). Os TLRs estão envolvidos no reconhecimento de padrões moleculares associados a agentes patogênicos (PAMPs) e a padrões moleculares associados a danos (DAMPs), levando à ativação da transcrição de genes que codificam as citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e moléculas co-estimuladoras. Portanto, os TLRs desempenham um papel importante na ligação entre a resposta imune inata e a resposta imune adaptativa (AKIRA e SATO, 2003; GALDIERO et al., 2004).

A esses receptores têm sido atribuído papéis importantes no desenvolvimento de doenças autoimunes, tais como a EM. Eles seriam um potencial mecanismo pelo qual a flora microbiana poderia regular as respostas autoimunes (REYNOLDS, 2012). Alguns estudos demonstraram o papel benéfico de TLR3 e um papel prejudicial de outros TLRs no aparecimento e na progressão da doença. Portanto, a modulação de TLRs pode representar uma nova abordagem imunoterapêutica e agonistas ou antagonistas de TLRs podem ser utilizados em diferentes estágios da EM (TOUIL et al., 2006; GOOSHE et al., 2014).

Sloane e colaboradores (2010) demonstraram que o TLR2 é expresso em oligodendrócitos e regulado positivamente em lesões da EM, sendo capaz de mediar os efeitos repressivos da maturação e remielinização em células precursoras de oligodendrócitos. TLR9 em humanos foi identificado em células dendríticas

plasmocitóides e reconhece DNA viral na fase inicial da infecção (LIU, 2005). TLR2 e TLR9 tem sido associados à resposta a infecção por diversos vírus, incluindo vírus herpes simplex (tipos 1 e 2), citomegalovírus, vírus da hepatite C, vírus Epstein-Barr, e Varicella-zoster (BIEBACK et al., 2002; COMPTON et al., 2003; DOLGANIUC et al., 2004). A ativação de TLR2 é seguida pela produção de citocinas inflamatórias, incluindo a IL-6, IL-8, e TNF- α (RIZZO et al., 2012).

TLR3 é expresso em células endoteliais cerebrais, neurônios, microglia, astrócitos e oligodendrócitos e a sinalização via este receptor induz a produção de interferons (IFNs) do tipo I que podem apresentar efeitos positivos na EM (BSIBSI et al., 2002; FARINA et al., 2005; LAFON et al., 2006; NAGYOSZI et al., 2010). Astrócitos humanos aumentam a produção de citocinas anti-inflamatórias, tais como a IL-10 e suprimem a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-12p40 e IL-23 em resposta a ativação de TLR3 (BSIBSI et al., 2002). Foi visto ainda que a expressão de TLR4 está aumentada em células mononucleares presentes no líquido de pacientes com EM, em comparação com controles saudáveis (ANDERSSON et al., 2008).

O papel dos TLRs na indução de interferons tipo 1 vem sendo discutido em vários estudos. Estes IFNs atuam como uma primeira linha de defesa contra a invasão de patógenos e como regem a resposta imune inata, atuam como um ponto essencial de contato entre as respostas imunes inata e adaptativa. (SONG et al., 2015). Em humanos, a família de IFNs tipo 1 consiste de um único gene que transcreve IFN- β e de 13 genes que são responsáveis pela transcrição de IFN- α (PERKINS e VOGEL, 2015).

Ligantes de TLRs, tais como lipopolissacarídeos (LPS, ligante de TLR4) e ácidos nucléicos (ligantes de TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9), induzem a produção de IFNs tipo 1 por meio da ativação de fatores de regulação de IFNs (OSHIUMI et al., 2003; YAMAMOTO et al., 2003; KAWAI et al., 2004; HONDA et al., 2005; KAWAI e AKIRA, 2010). De forma interessante, um estudo mostrou como um ligante de TLR3 foi capaz de induzir a produção de IFN- β e inibir o desenvolvimento da doença autoimune em um modelo experimental de EM (TOUIL et al., 2006).

Atualmente, os tratamentos modificadores da doença (TMDs), envolvem agentes imunossupressores ou imunomoduladores e têm sido a escolha para o tratamento da EM (revisto por MATTHEWS, 2015). O IFN- β é um dos

imunomoduladores disponíveis para o tratamento de pacientes com a forma remitente-recorrente que mostra efeitos significativamente benéficos sobre a progressão da incapacidade e sobre a taxa de recidiva (GOODIN e BATES, 2009).

O IFN- β suprime a resposta inflamatória em pacientes com EM através de vários mecanismos, incluindo a expressão de moléculas co-estimuladoras, o bloqueio da ativação das células T, controlando as citocinas pró e anti-inflamatórias, evitando a migração de células imunes ativas e promovendo o reparo de danos das células nervosas, através da diferenciação de células tronco neurais em oligodendrócitos (VOSOUGHI e FREEDMAN, 2010; HERNÁNDEZ-PEDRO et al., 2013; KAY, HOJATI e DEHGHANIAN, 2013).

Durante a EM, estudos mostraram uma expressão local de IFN- β nas lesões, que suprime a secreção de quimiocinas pela micróglia ativada no SNC. Isto resulta em redução da migração de linfócitos e também reduz a captação e a apresentação de antígenos por macrófagos e por células dendríticas (PRINZ et al., 2008). A micróglia ativada secreta citocinas inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1 β , glutamato, superóxido e óxido nítrico, que são neurotoxinas e causam dano em paciente com EM. O IFN- β pode suprimir a secreção destas neurotoxinas e evitar a apoptose de células neurais conferindo um papel protetor no curso da doença (revisto por DHIB-JALBUT e MARKS, 2010).

A diversidade dos sintomas, a forma de evolução clínica e as respostas imunes envolvidas estão na base da apresentação da doença e aumentam a complexidade do diagnóstico e do tratamento (HOHLFELD e WEKERLE, 2004; WIENDL e HOHLFELD, 2009). Um grande progresso foi alcançado nas últimas décadas na compreensão dos mecanismos da fase remitente-recorrente, porém a EM permanece incurável e as opções de tratamento são limitadas aos fármacos modificadores da doença, tais como acetato de glatiramer, natalizumab, azatioprina, ciclofosfamida e IFN- β (GARCÍA MERINO et al., 2016).

Um dos aspectos mais difíceis na pesquisa da EM é a busca de marcadores prognósticos que possam ajudar na escolha do tratamento. Atualmente, a estratégia comum é começar com as drogas modificadoras da doença nos primeiros estágios, a fim de retardar a conversão de uma síndrome clinicamente isolada, em EM clinicamente definida, além de evitar a mudança do curso remitente-recorrente, para

progressiva secundária (TROJANO et al., 2011; COMI et al., 2013; NAGTEGAAL et al., 2014).

Variáveis demográficas e clínicas, como uma idade mais avançada no início, alta taxa de recidiva precoce e sexo masculino, em conjunto com a carga da lesão e outras medidas avaliadas através de ressonância magnética têm sido referidas como fatores determinantes da transição rápida para a EM progressiva (SCALFARI et al., 2014). Nos homens a manifestação da EM tende a ocorrer relativamente mais tarde na vida adulta e coincide com o início do declínio na testosterona biodisponível, entretanto a progressão do acúmulo de deficiência no sexo masculino é mais pronunciada (DUNN, GUNDE E LEE, 2015).

2.2 A ENCEFALOMIELEITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL

A encefalomielite autoimune experimental é o principal modelo animal de estudo da EM. Embora existam limitações impostas pelo uso de modelos experimentais para a compreensão das doenças humanas, a interação entre os estudos realizados na EAE e a EM tem sido extremamente produtiva ao longo dos anos (revisito por MIX, MEYER-RIENECKER e ZETTL, 2008). A EAE pode ser induzida em diversos tipos de animais de laboratório (por exemplo, camundongos, ratos, cobaias e primatas) após a sensibilização com antígenos da mielina, emulsionados em adjuvante completo de Freund's (CFA) (GOLD, LININGTON e LASSMANN, 2006; STROMNES e GOVERMAN, 2006a).

A proteína básica da mielina (PBM), um importante componente da mielina, foi a primeira proteína utilizada para a indução da doença. Subsequentemente, diversos antígenos da mielina, tais como a proteína proteolipídica da mielina (PPL) e a glicoproteína mielínica de oligodendrócitos (MOG), foram utilizados (BATOULIS et al., 2011). Como alternativa ao modelo de indução ativa da EAE, as células T autorreativas, obtidas a partir de animais imunizados, podem ser adotivamente transferidas para animais saudáveis, criando assim um modelo "passivo" de indução (STROMNES e GOVERMAN, 2006b).

As características clínicas e patológicas da doença dependem do autoantígeno e dos adjuvantes utilizados, bem como da espécie, estirpe, sexo e idade dos animais experimentais como observado na tabela 1 (revisado por VAN DER STAR et al., 2012). Os sintomas clínicos manifestam-se como paralisia ascendente, começando na cauda e membros posteriores e pode ocorrer de forma monofásica aguda, como em camundongos SJL/J imunizados com peptídeo PBM₈₉₋₁₀₁ (MEKALA e GEIGER, 2005), de forma crônica, como em camundongos C57BL/6 imunizados com peptídeo MOG₃₅₋₅₅ (WANG et al., 2016) ou de forma remitente-recorrente, como em camundongos SJL/J imunizados com peptídeo PLP₁₃₉₋₁₅₁ (XIE et al., 2016).

Tabela 1: Modelos clássicos de EAE (Adaptada: BATOULIS et al., 2011).

Curso da doença	Animal	Linhagem	Antígeno
Remitente-recorrente	Camundongo	SJL/J	PLP:139–151
Remitente-recorrente	Camundongo	C57BL/6	Low dose MOG:35–55
Remitente-recorrente	Rato	Dark agouti	MOG:1–125
Crônica	Camundongo	C57BL/6	MOG:35–55
Crônica	Camundongo	C57BL/6	PLP:178–191
Crônica	Camundongo	C57BL/6	MP4
Crônica	Rato	Lewis N1	MOG
Monofásica	Camundongo	B10.PL	PBM
Monofásica	Camundongo	PL/J	PBM
Monofásica	Rato	Lewis	PBM

O mais empregado modelo de EAE é induzido com glicoproteína miélica de oligodendrócitos, provavelmente devido à capacidade do MOG de induzir a doença em camundongos C57BL/6, muito utilizados para estudos em imunologia e por possuírem uma variedade de animais transgênicos e *knockout* (VAN DER STAR et al., 2012). Além disso, o MOG é um autoantígeno da mielina capaz de conduzir à resposta de células T encefalitogênicas, mas também uma resposta de autoanticorpos desmielinizante, o que aumenta a gravidade da doença mediada pelas células T. Essa combinação permite melhor reprodução da complexidade

patológica e clínica da EM (GOLD, LININGTON e LASSMANN, 2006; MARTA, MEIER e LOBELL, 2009).

Os adjuvantes utilizados para a indução da EAE contêm frequentemente micobactérias inativadas que induzem respostas de células T, bem como a produção de anticorpos, devido à ativação do sistema imune inato via TLRs (LIBBEY e FUJINAMI, 2011). A incidência e a gravidade da doença induzida pela imunização com neuroantígenos é aumentada pela co-injeção de toxina pertussis (HOFSTETTER, SHIVE e FORSTHUBER, 2002), que é utilizada para aumentar a expansão de células T autorreativas, principalmente as células de perfil Th1, aumentar a produção de citocinas inflamatórias, induzir moléculas de adesão endotelial no cérebro e alterações na barreira hemato-encefálica (CHEN et al., 2006; FUJIMOTO et al., 2006).

A co-administração da toxina *pertussis* aumenta a permeabilidade dos vasos sanguíneos na barreira hemato-encefálica, além de regular negativamente o número e a função das células T reguladoras (CHEN et al., 2006). O estudo de Mohajeri e colaboradores (2015) mostrou que a administração da toxina, após a indução da EAE em ratos Lewis, com homogeneizado de medula espinhal de cobaia (GPSCH), converteu a EAE monofásica em uma forma remitente-recorrente, com escore clínico mais grave acompanhado de aumento da inflamação e do estresse oxidativo.

Outros estudos mostraram que a toxina pertussis utiliza a sinalização via TLR4 para mediar o seu efeito de indução da EAE (RACKE, HU e LOVETT-RACKE, 2005; WANG et al., 2006). Enquanto, CFA contém ligantes microbianos dos TLRs 2, 4 e 9, sendo indutor de uma resposta imunológica do tipo Th1 (TIGNO-ARANJUEZ et al., 2009). *Mycobacterim tuberculosis* produz múltiplas lipoproteínas que estimulam TLR2 (BANAIEE et al., 2006) e estudos mostraram que TLR2 é um receptor co-estimulador tanto de células T CD4⁺, quanto de células T CD8⁺ (KOMAI-KOMA et al., 2004; IMANISHI et al., 2007; Cottalorda et al., 2009).

Na indução ativa da EAE, o animal é imunizado com uma injeção subcutânea da emulsão contendo o antígeno de mielina e o adjuvante completo de Freund (CFA) junto à base da cauda, acompanhado por uma injeção intraperitoneal de toxina *pertussis* no dia da imunização e dois dias após (BITTNER et al., 2014). Após esta imunização, as APCs na periferia apresentam os antígenos da mielina para as células T CD4⁺, o que leva a sua ativação e subsequente geração de células

pró-inflamatórias Th1 e Th17 autorreativas, além da ativação de células B e monócitos (FROHMAN, RACKE e RAINE, 2006).

As células T autorreativas migram e interagem com moléculas de adesão na superfície endotelial de vênulas no SNC e atravessam a barreira hemato-encefálica rompida com o auxílio de proteases e quimiocinas (PICCIO et al., 2002; VERCELLINO et al., 2008; HOLMAN, KLEIN e RANSOHOFF, 2011). A migração específica do subconjunto de células Th1 que expressam os receptores CXCR3 e CCR5 é influenciada pela quimiocina CCL5 (MISU et al., 2001). Enquanto as células Th17 expressam o receptor CCR6 que é ligante da quimiocina CCL20, expressa em células epiteliais no plexo coróide (PÖTZL et al., 2008; REBOLDI et al., 2009).

Como pode ser observado na figura 5, após a entrada no SNC, as células T são reativadas por APCs locais que apresentam os antígenos alvo, que incluem a proteína básica de mielina, a glicoproteína associada à mielina e a glicoproteína mielínica de oligodendrócitos. A resposta imunológica é amplificada, resultando em cascatas inflamatórias, envolvimento de outras células, como monócitos ou macrófagos, desmielinização e perda axonal (GOVERMAN, 2009; FLETCHER et al., 2010).

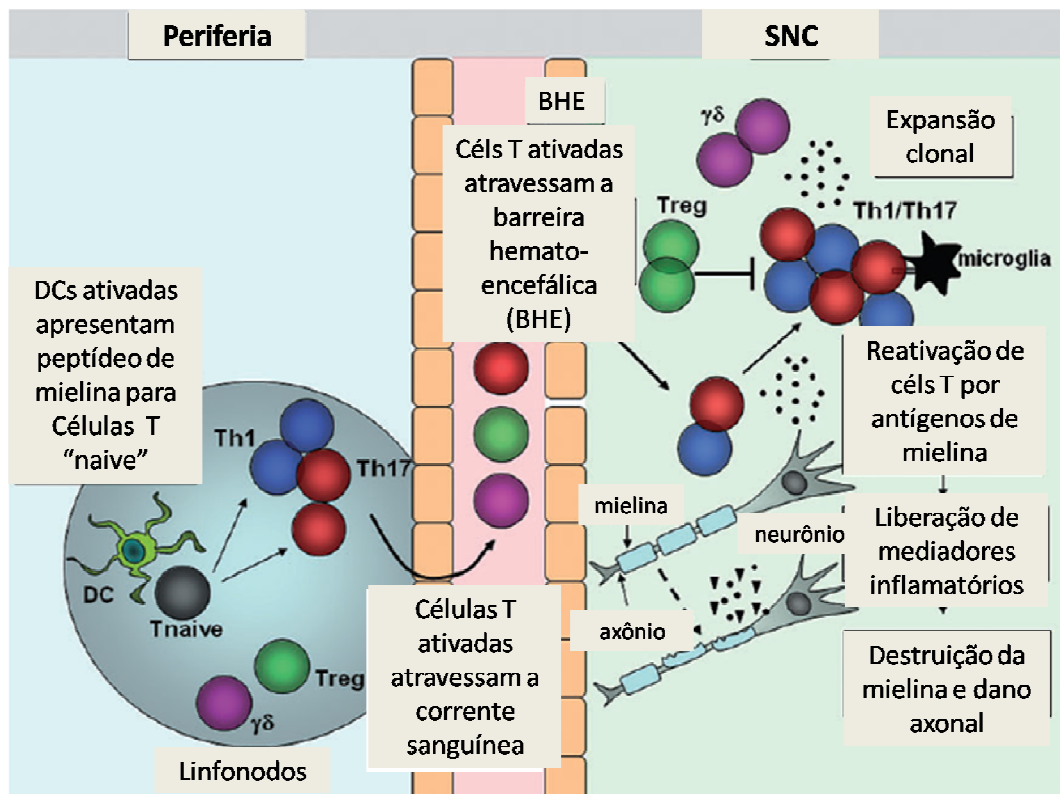


Figura 5: Migração e função de células T efetoras durante a EAE (adaptado de FLETCHER et al., 2010).

A reação inflamatória nas lesões da EM, que consiste principalmente de células T ativadas e ativação de microglia/macrófagos é semelhante ao observado nos modelos de EAE clássicos. Porém, existem algumas diferenças importantes (revisto por GOLD et al., 2006). Na maioria dos modelos de EAE, que são desencadeados por células Th1 ou Th17, a inflamação começa com o infiltrado do tecido por células T CD4⁺ restritas ao MHC de classe II, seguido pela ativação da microglia e recrutamento de macrófagos para as lesões (FLUGEL et al., 2001).

O recrutamento de células T CD8⁺ geralmente acontece alguns dias após o infiltrado de células T CD4⁺ inicial (HICKEY, COHEN e BURNS, 1987; SKULINA et al., 2004). Em contraste, nas lesões da EM, independente do estágio de desenvolvimento, é a população de célula T CD8⁺ que sempre predomina e mostra expansão clonal preferencial (MARIK et al., 2007; HENDERSON et al., 2009). Na EAE, os estudos já atribuíram às células T CD8⁺ tanto a função reguladora (MONTERO et al., 2004), quanto uma ação patogênica (FORD e EVAVOLD, 2005; SAXENA et al., 2008).

O papel patogênico das células Th1 secretoras de IFN- γ e das células Th17 secretoras de IL-17 já foi bem demonstrado na EAE (KROENKE et al., 2008; STROMNES et al., 2008). A transferência adotiva de células Th1 específicas para o antígeno MOG é capaz de induzir a EAE, a qual é caracterizada por infiltrado predominante de macrófagos no SNC (KROENKE et al., 2008). Além disso, as células Th1 promovem inflamação e facilitam o infiltrado de células Th17 para o SNC (O'CONNOR et al., 2008), enquanto a inflamação induzida por células Th17 no SNC é caracterizada pelo recrutamento de neutrófilos (KROENKE et al., 2008) e morte de neurônios (KEBIR et al., 2007).

Além do papel atribuído ao IFN- γ como citocina pró-inflamatória e seu papel patogênico na autoimunidade, trabalhos vêm mostrando que o IFN- γ desempenha também um papel protetor, induzindo a atividade de células reguladoras e modulando a resposta de células T efetoras (KELCHTERMANS, BILLIAU e MATTHYS, 2008; SHACHAR e KARIN, 2013). As Tregs são essenciais na manutenção da tolerância imunológica e na prevenção da autoimunidade. A ação benéfica de diversos compostos sobre a EAE, já foi demonstrada através da diminuição das respostas Th1/Th17 e aumento da frequência de Treg e da síntese

de IL-10 e TGF- β , no SNC (ÁLVAREZ-SÁNCHEZ et al., 2015; LI et al., 2015; SPANIER et al., 2015).

Além das diferenças nos mecanismos da resposta imunológica, a EAE também sofre críticas em relação à localização das lesões nos vários modelos existentes, particularmente no induzido pelo peptídeo MOG em camundongos C57BL/6. Nesse modelo, as lesões estão principalmente localizadas na medula espinhal e no nervo óptico, o que se assemelha mais com a neuromielite óptica, do que com a EM (CONSTANTINESCU et al., 2011; JACOB et al., 2013). No entanto, danos generalizados em regiões cerebrais (por exemplo, no córtex, corpo caloso, cerebelo e tronco cerebral) têm sido demonstrados por imuno-histoquímica e ressonância magnética em induções com MOG e com PLP (AHARONI et al., 2013).

Com o protocolo de imunização ativa, os primeiros sinais da doença neurológica, geralmente perda de peso e de atividade, são observados entre o 10° e o 17° dias após a indução. Enquanto no método de transferência adotiva, os sinais são observados um pouco mais cedo, a partir do 5° ou 7° dia após a transferência das células encefalitogênicas (VAN DER STAR et al., 2012). Os sinais clínicos da EAE são normalmente classificados em uma escala numérica, que reflete o aumento dos níveis de paralisia e incapacidade do animal (DE PAULA et al., 2008).

Apesar das diferenças encontradas entre o modelo de EAE e a EM, quando visto em sua totalidade, o modelo animal tem sido usado com sucesso para estudar mecanismos de relevância para a EM e permitido o desenvolvimento de novas intervenções terapêuticas. Além disso, constitui-se em um modelo bem caracterizado e o avanço em tecnologias de genética, permitiu o desenvolvimento de animais transgênicos para o estudo de genes específicos ou populações de células e contribuíram para a compreensão de vias celulares e moleculares na patogênese da EM (BEN-NUN et al., 2014).

2.3 EFEITO NEUROPROTETOR DOS ESTRÓGENOS

Há diversas observações que indicam diferenças relacionadas ao sexo, no risco de desenvolver EM. Estudos epidemiológicos têm mostrado que a doença

apresenta maior incidência no sexo feminino em relação ao sexo masculino, na proporção de 3:1 aproximadamente, na maioria das regiões do mundo. Mostrando que as mulheres são mais propensas a desenvolverem EM (TROJANO et al., 2012). O período de gravidez também chama atenção por apresentar uma diminuição do risco de recaída durante o terceiro trimestre de gestação, seguido de aumento do risco durante o período de pós-parto (RHONDA, VOSKUHLE e STEFAN, 2012).

As diferenças de gênero na propensão ao desenvolvimento da autoimunidade podem ser influenciadas por diversos fatores, entre eles, as diferenças entre o sistema imunológico de homens e mulheres (MARKLE e FISH, 2014; RUBTSOVA, MARRACK e RUBTSOV, 2015). De forma geral, os machos têm maior imunossupressão, quando comparados às fêmeas (MCKEAN e NUNNEY, 2005; VINCENT e GWYNNE, 2014), enquanto as fêmeas apresentam aumento da reatividade imunológica (HEWAGAMA et al., 2009).

Essa diferença tem sido atribuída ao maior gasto de energia na produção do gameta feminino, em relação ao masculino. O investimento relativamente grande por parte das fêmeas com a produção de gametas e a reprodução é dependente da longevidade, sendo que esta relaciona-se diretamente com maior imunocompetência (VINCENT e GWYNNE, 2014). Portanto, essa maior atividade imunológica pode resultar em maior resistência a algumas doenças infecciosas, mas também é possível que resulte em maior propensão a desenvolver doenças autoimunes (ZANDMAN-GODDARD, PEEVA e SHOENFELD, 2007).

Este viés de gênero na suscetibilidade à doença autoimune pode ser influenciado também pelos efeitos de hormônios. O papel dos estrógenos na imunidade tem sido extensivamente avaliado (BOUMAN, HEINEMAN e FAAS, 2005). Eles podem afetar o sistema imunológico, modulando a produção de citocinas, a expressão de seus receptores e regulando as respostas de diferentes células efectoras (STRAUB, 2007; CUTOLO e STRAUB, 2007). Além da fonte de estrogênio endógeno, o sistema imunológico pode ser alvo de diferentes produtos químicos, moléculas presentes no ambiente e que apresentem atividade estrogênica, os chamados estrogênios ambientais (AHMED, 2000).

Nas mulheres, os níveis circulantes de estrogênios mudam em relação à função reprodutiva e diferentes níveis de exposição a estrogênios afeta a imunidade. Em concentrações elevadas, tal como na gravidez, o estrogênio inibe as vias pró-

inflamatórias Th1 (incluindo TNF- α , IL-1 β e IL-6) e estimula as vias anti-inflamatórias Th2 (incluindo IL-4, IL-10 e TGF- β). Por outro lado, níveis baixos como observado após a menopausa, estimulam as vias pró-inflamatórias (incluindo TNF- α e IL1- β) (STRAUB, 2007). Desta forma, os estrogênios podem afetar diferencialmente a incidência da autoimunidade em relação à idade e à capacidade reprodutiva.

Esses hormônios agem através de subtipos de receptores de estrogênio (ERs) intracelulares, alfa (ER α) e beta (ER β). Estrogênios endógenos incluem estrogênio (E1), estradiol (E2) e estriol (E3, produzido apenas durante a gravidez), sendo o 17 β -estradiol (E2) o mais potente estrogênio produzido no corpo humano (KOVATS, 2015). Estes hormônios influenciam o crescimento, a diferenciação e o funcionamento de muitos tecidos alvo, tal como, o sistema reprodutor feminino e o masculino. Desempenham também um papel importante na manutenção de ossos, no sistema nervoso central e no sistema cardiovascular, no qual podem ter alguns efeitos cardioprotetores (PARE et al., 2002; MILLER et al., 2004; KIM, KIM e JEONG, 2016; MAGGIOLI et al., 2016).

Na EM e na EAE, alguns estudos têm atribuído aos estrogênios efeito anti-inflamatório e neuroprotetor, pois diminuem biomoléculas pró-inflamatórias específicas para autoantígenos (tais como, IFN- γ , TNF- α , IL-17, iNOS, e MCP-1), inibindo a inflamação e a desmielinização (GARIDOU et al., 2004; ELLOSO et al., 2005; TIWARI-WOODRUFF e VOSKUHL, 2009; LÉLU et al., 2011). O tratamento com agonistas de ERs foi capaz de proteger a matéria cinzenta da atrofia, preservando as células de Purkinje na EAE (MACKENZIE-GRAHAM et al., 2012). Além disso, o tratamento com 17 β -estradiol inibiu a expansão de células T CD4⁺ e aumentou a proporção de Tregs produtoras de IL-10 na EAE (PETTERSSON et al., 2004).

Estudos em modelos animais mostraram que os efeitos dos estrogênios sobre o sistema imune periférico é dependente da sinalização do ER α . O tratamento com um ligante de ER α , propil pirazol triol (PPT), mas não com ligante de ER β , *diaryl-propionitrile* (DPN), resultou na diminuição da produção de metaloproteinases de matriz 9, uma enzima envolvida na transmigração de células T e monócitos para o SNC e diminuiu o infiltrado de células T e macrófagos para o SNC (GOLD et al., 2009).

Outros estudos sobre a resposta imune em animais tratados com ligantes de ERs têm sugerido que o ER β pode afetar a infiltração de células dendríticas para o SNC (DU et al., 2011) e ligantes de ER β se mostraram capazes de modular a função das células T (WU et al., 2013). Estrógenos endógenos, bem como ligantes exógenos de ER β podem apresentar atividade sobre os mecanismos inflamatórios no SNC, principalmente através dos seus efeitos sobre a micróglia (SAIJO et al., 2011; WU et al., 2013).

Estradiol também exerce efeito protetor em astrócitos, via regulação da gliose, neuroinflamação, edema, transporte de glutamato, bem como aumento da liberação de fatores neurotróficos (ACAZ-FONSECA et al., 2014). Os estrogênios também são capazes de modular a produção de óxido nítrico e de citocinas pró-inflamatórias *in vitro* e diminuir a reatividade microglial *in vivo* em resposta a estímulos inflamatórios e neurodegenerativos (JOHANN e BEYER, 2013; AREVALO, AZCOITIA e GARCIA-SEGURA, 2015).

No modelo de EAE, o tratamento com estradiol foi capaz de alterar a produção de citocinas, de receptores de quimiocinas e a expressão de moléculas de adesão, conduzindo a um perfil anti-inflamatório (MATEJUK et al., 2003; SUBRAMANIAN et al., 2003). Em outro estudo, as células mononucleares de tecido cerebral de camundongos com EAE, tratados com estradiol, mostrou diminuição na produção de TNF- α , IFN- γ e de outros mediadores inflamatórios, além da diminuição da desmielinização (BODHANKAR et al., 2011). Em conjunto, estes estudos sugerem o potencial terapêutico dos estrógenos na neuroinflamação e no tratamento da EM.

2.4 GENISTEÍNA

A genisteína (4',5,7-tri-hidroxi-isoflavona) é uma das principais isoflavonas da soja e, por conseguinte, amplamente presente na dieta humana (LIGGINS et al., 2000; LIGGINS et al., 2002; MENZE et al., 2015). Apresenta propriedades antioxidante e anti-inflamatória (MAROTTA et al., 2006; JI et al., 2011) e seu possível uso como agente capaz de prevenir o câncer, tem sido amplamente

estudado (NING et al., 2014; WANG, JENKINS e LAMARTINIERE, 2014). Relatórios epidemiológicos revelaram correlações significativas entre o consumo de genisteína e um risco reduzido de câncer de mama (QIN et al., 2006; IWASAKI e TSUGANE, 2011).

Como pode ser observado na figura 6, a genisteína apresenta semelhança estrutural com o 17 β -estradiol (KUIPER et al., 1998), o que permite que ela possa se ligar às duas isoformas do receptor de estrogênio, ER α e ER β (COOKE, SELVARAJ e YELLAYI, 2006; GANAI e FAROOQI, 2015). No entanto, é um agonista seletivo para o ER β , uma vez que a afinidade de ligação com o ER β é cerca de 7 vezes maior do que com o ER α (KUIPER et al., 1997).

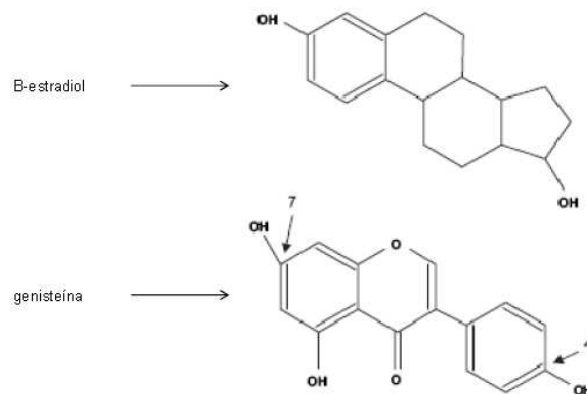


Figura 6: Estrutura molecular do β -estradiol e da genisteína (Adaptado: SOUCY et al., 2006)

Alguns estudos mostraram que a genisteína tem uma grande variedade de alvos moleculares, incluindo fatores de transcrição, fatores de crescimento e os seus receptores, citocinas, enzimas e regulação da proliferação celular e da apoptose. Por isso, a essa isoflavona é atribuído vários efeitos terapêuticos, tais como, efeito anti-inflamatório, antiangiogênese, antioxidante, antiproliferativo e protetor cardiovascular (DHARMAPPA et al., 2010; KIM et al., 2011; PALANISAMY, KANNAPPAN e ANURADHA, 2011; LUO et al., 2012).

Diante de inúmeros efeitos terapêuticos, a utilização de fitoestrógenos como a genisteína pode representar uma alternativa à terapia com estrogênios no tratamento de doenças neurodegenerativas, uma vez que o uso terapêutico dos estrógenos encontra resistência, sobretudo, devido a vários efeitos secundários deletérios associados a eles, incluindo aumento do risco de trombose, doença

cardíaca, acidente vascular cerebral e efeitos feminilizantes no sexo masculino (NEF e PARADA, 2000; PAGANINI-HILL, 2001).

Os fitoestrógenos podem se ligar aos receptores de estrogênio em vários tipos de células (SIROTKIN e HARRATH, 2014). São capazes de atuar como agonistas ou antagonistas do receptor, dependendo do tecido (BECK, ROHR e JUNGBAUER, 2005). São encontrados em uma variedade de produtos alimentares, tais como as leguminosas, que contém genisteína e daidzeína, entre outras isoflavonas (AZCOITIA et al., 2006; MICHEL et al., 2013; SHAMBAYATI et al., 2014).

Em virtude de seu efeito anti-inflamatório, o papel terapêutico da genisteína já foi demonstrado em doenças autoimunes. No tratamento da artrite reumatóide a genisteína regula negativamente o fator nuclear kappa B (NF- κ B), levando a uma diminuição na expressão das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 e IL-6 (KIM et al., 2011; PALANISAMY, KANNAPPAN e ANURADHA, 2011). Verdreng e colaboradores (2003) estudaram a influência da genisteína na artrite induzida por colágeno em camundongos, sendo que os resultados sugerem que a administração subcutânea de genisteína exerce seus efeitos anti-inflamatórios afetando as propriedades de granulócitos, monócitos e linfócitos, mostrando que a genisteína é capaz de prevenir a doença.

Outro estudo mostrou que a administração oral de genisteína (6 a 20 mg/kg/dia) aumenta a resistência do hospedeiro ao tumor e induz um aumento, dependente da dose, da atividade de células T citotóxicas e células NK, em fêmeas adultas de camundongos B6C3F1 (GUO et al., 2001). Além disso, sugere-se que a administração oral de 20 mg/kg de genisteína poderia suprimir a resposta imune antígeno-específica em camundongos BALB/c imunizados com ovalbumina (KOGISO et al., 2006). Posteriormente, Wang e colaboradores (2011) relatam que a genisteína pode modular a atividade imunológica e tem efeitos antagonistas sobre lesões nas articulações na artrite induzida por colágeno. Reforçando que os efeitos imunomoduladores da genisteína podem prevenir a doença autoimune.

Alguns estudos mostraram também o efeito do tratamento com genisteína sobre a EAE. De Paula e colaboradores (2008) trataram camundongos C57BL/6 com 200 mg/kg de peso de genisteína por via subcutânea, após a indução da EAE, durante 7 dias após o aparecimento dos sinais da doença e observaram que o

tratamento melhorou significativamente os sintomas clínicos, modulando as citocinas pró e anti-inflamatórias. Além disso, o tratamento resultou em diminuição da aderência e rolamento de leucócitos, em comparação com o grupo não tratado.

Posteriormente, Castro e colaboradores (2012) trataram camundongos C57BL/6 com 200 mg/kg de peso, com um análogo da genisteína por via subcutânea, após o aparecimento dos sinais da EAE e observaram que o composto obtido a partir da genisteína foi capaz de melhorar a evolução clínica da EAE, o que se correlacionou com a diminuição da produção de células produtoras de IL-17 e o aumento das células T CD4⁺Foxp3⁺ no cérebro. Além disso, o análogo aumentou a produção de IL-10 e a expressão de CTLA-4 e reduziu a produção de IFN- γ e IL-6.

Estes dados em conjunto, sugerem o potencial terapêutico da genisteína no tratamento da EM. Contudo, estes estudos mostraram os resultados obtidos em protocolos de tratamento após o aparecimento dos sinais clínicos da doença e não abordavam a resposta imunológica inata. Os TLRs, por sua vez, são a classe mais importante e os primeiros receptores de reconhecimento de padrões no sistema imune inato. Desempenham um papel crítico no início das respostas inflamatórias e na promoção das respostas imunes adaptativas (LI et al., 2009).

Neste contexto, o atual trabalho busca compreender a modulação da resposta imune inata e a influência desta na resposta imune adaptativa através dos receptores *toll like*, utilizando um tratamento com genisteína anterior ao aparecimento dos sinais clínicos da EAE e avaliando parâmetros clínicos e imunológicos no início do desenvolvimento da doença. Os efeitos benéficos do tratamento da EAE com genisteína, sugerem que o consumo desse fitoestrógeno na alimentação ou como suplemento pode se associar a já estabelecidas terapias para a EM e reduzir a gravidade e a frequência dos surtos da doença.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do tratamento com genisteína, anterior ao aparecimento dos sinais clínicos, sobre a evolução clínica da EAE, histopatologia, receptores *toll like*, fatores de transcrição e produção de citocinas pelos subconjuntos de linfócitos T, durante o desenvolvimento da EAE.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar durante 21 dias os sinais clínicos da EAE nos animais induzidos tratados ou não com genisteína;
- Realizar análise histológica da medula espinhal no 7º, 14º e 21º dias após a indução do modelo, através das colorações de hematoxilina-eosina e *luxol fast blue*;
- Avaliar a expressão de TLR2, TLR3, TLR4, TLR9, IL-10, CD11c, F4/80 e Foxp3 em células da medula espinhal, através de citometria de fluxo, no 7º dia após a indução do modelo;
- Quantificar a produção de citocinas (IL-6, IL-17A, IL-12p40, IL-10, TGF- β e IFN- γ) e quimiocinas (CCL5 e CCL20), através da técnica de ELISA, no homogenato de macerados da medula espinhal, no 7º dia após a indução do modelo;
- Avaliar a expressão relativa do RNAm dos fatores de transcrição T-bet e ROR γ t e de IFN- β em células da medula espinhal, através da técnica de qRT-PCR, no 7º dia após a indução do modelo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Para a indução da EAE foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6, fêmeas, com 6-8 semanas de idade, provenientes do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). Os animais foram mantidos no setor de experimentação do Laboratório de Imunologia do ICB/UFJF, acondicionados em estantes ventiladas e receberam ração e água *ad libitum*. Todos os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos postulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais da UFJF (protocolo nº 037/2012).

4.2 PROTEÍNA MIELODENDRÍTICA

O peptídeo MOG₃₅₋₅₅ foi sintetizado pelo Dra Maria Aparecida Juliano do Deptº de Biofísica– INFAR- UNIFESP. O peptídeo foi ressuspenso em PBS estéril e obteve 90% de pureza, determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectrometria de massa.

4.3 INDUÇÃO DO MODELO DE EAE

Cada animal foi imunizado por via subcutânea (s.c.) em ambos os lados da base da cauda com 100 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ e Adjuvante de Freund suplementado com 400 µg de *Mycobacterium tuberculosis* (H37RA; Difco Laboratories, Detroit, MI), com aplicação de 300 ng de toxina pertussis divididos em

duas doses, a primeira aplicada no dia da indução e a segunda 48 horas após a indução. Os controles negativos seguiram o mesmo protocolo excetuando-se a aplicação da emulsão contendo o MOG₃₅₋₅₅ e a toxina (LEADBETTER et al., 1998).

4.4 TRATAMENTO COM GENISTEÍNA

Os grupos de animais tratados com genisteína (CAYMAN CHEMICAL) (Tabela 1) receberam 200 mg/kg de peso via subcutânea por dia de genisteína previamente solubilizada em Dimetilsulfoxido (DMSO – Sigma-Aldrich) e diluída em solução fisiológica conforme descrito no trabalho de De Paula e colaboradores (2008). O tratamento foi iniciado 2 dias antes da indução da EAE e prosseguiu durante mais 5 dias após a indução, totalizando, portanto, 7 dias de tratamento.

4.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O escore clínico dos animais foi avaliado até o 21º dia após a indução do modelo. Além disso, a medula espinhal dos animais dos três grupos estudados, Controle (não induzido/não tratado), EAE (induzido/não tratado) e GEN (induzido/tratado com genisteína) foi coletada e os seguintes parâmetros avaliados: expressão relativa de RNAm de ROR γ T, T-bet e IFN- β , intensidade mediana de fluorescência de Foxp3 e IL-10, produção de citocinas (IL-12p40, IFN- γ , IL-17A, IL-6, TGF- β e IL-10), de quimiocinas (CCL5 e CCL20), intensidade mediana de fluorescência de TLR2, TLR3, TLR4 E TLR9 e análise histológica.

Tabela 2: Distribuição dos animais em grupos

Grupos/dias avaliados	Parâmetro avaliado (nº de animais utilizados)		
	Controles	EAE	GEN
7º dia pós-indução	Citocinas (6)	Citocinas (6)	Citocinas (6)
	Citometria (8)	Citometria (8)	Citometria (8)
	RT-PCR (4)	RT-PCR (4)	RT-PCR (4)
	Histologia (3)	Histologia (3)	Histologia (3)
14º dia pós-indução	Histologia (3)	Histologia (3)	Histologia (3)
21º dia pós-indução	Escore clínico (8)	Escore clínico (8)	Escore clínico (8)
	Histologia (3)	Histologia (3)	Histologia (3)

4.6 AVALIAÇÃO DO CURSO CLÍNICO E DA MASSA CORPORAL

Vinte e quatro animais foram divididos entre os três grupos experimentais (8 animais/grupo) e tiveram seu escore clínico acompanhado. A avaliação do escore clínico e da massa corporal foi realizada do 2º dia antes da indução até o 21º dia pós indução. Os animais foram diariamente pesados, clinicamente avaliados e classificados com relação à incapacidade neurológica através da escala apresentada na tabela 3, adaptada por De PAULA e colaboradores (2008). O escore final de cada animal corresponde ao somatório da pontuação obtida em todos os parâmetros avaliados em um mesmo dia.

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

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

4.7 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DOS ÓRGÃOS E CÉLULAS

A eutanásia foi realizada com dose letal de Xilazina (10 mg/Kg) e Ketamina (150 mg/Kg) no 7º, 14º ou 21º dias pós indução. Após estarem completamente anestesiados, parte dos animais foram perfundidos intracardialmente por uma solução de paraformaldeído 4% para a retirada da medula espinhal para a análise histológica (3 animais/grupo). Os outros animais foram perfundidos com PBS para a retirada da medula espinhal e avaliação dos outros parâmetros desejados (18 animais/grupo).

4.8 RT-PCR EM TEMPO REAL E ANÁLISE DE PCR QUANTITATIVA PARA ROR γ T, T-BET E IFN- β

As medulas espinhais foram coletadas individualmente no 7º dia pós indução para a avaliação da expressão gênica por qRT-PCR de ROR γ T, T-bet e IFN- β . As medulas espinhais coletadas foram imediatamente imersas em RNAlater (Ambion, Austin, TX), armazenadas a 4° C por 24 h e em seguida a -80° C, até posterior caracterização. O RNA total foi extraído das amostras utilizando RNeasy mini kits (Qiagen, Valencia, CA), com o auxílio de um homogeneizador de tecidos (Qiagen, Valencia, CA), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de RNA foram tratadas com RNase-Free DNase Set (Qiagen, Valencia, CA) para remoção de possíveis resíduos de DNA genômico. Ao final deste processo, foi gerado um volume de 40 μ L de solução (RNA total + 40 μ L de água RNase-free). Pequena quantidade de RNA (0,5 μ g) foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em brometo de etídio e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta (UV) para verificar a integridade do material pela presença das bandas de RNA ribossomais 28S e 18S. A concentração de RNA foi avaliada por espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, San Jose, CA). O RNA quantificado foi armazenado a -80° C até o momento de sua utilização na síntese de DNA complementar (cDNA). Posteriormente, um micrograma de RNA foi utilizado para sintetizar cDNA usando Super Script III First Strand (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA sintetizado foi então quantificado em espectrofotômetro e utilizado nas reações de PCR em tempo real. A seguir, um micrograma de DNAc foi amplificado na presença de SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) e primers específicos para os genes em estudo (Sigma-Aldrich). As amostras foram submetidas a 40 ciclos nas seguintes condições de termociclagem: 95° C por 15 segundos, temperatura de anelamento por 20 segundos e 60° C por 30 segundos. Ao final, uma etapa adicional de dissociação foi realizada (40 ciclos com um decréscimo de 1° C a cada 15 segundos, iniciando-se em 95° C) para a geração de uma curva de *melting*. A análise desta curva permitiu verificar a especificidade da reação, ou seja, se não havia a presença de bandas inespecíficas e/ou dímeros de primers. A análise dos

dados gerados foi feita com o auxílio do software Real-Time System RQ Study software V1.3.1 9 (Applied Biosystems). Por meio deste software determinou-se o ponto de corte, denominado de “threshold cycle” (Ct) ou limiar de detecção, de cada amostra testada. Quanto maior a concentração inicial, mais precoce o Ct. Assim, construiu-se uma curva-padrão na qual foram plotados os resultados das amostras em investigação, permitindo a sua quantificação. Para controlar as variações na quantidade de amostra, na quantidade e qualidade do RNA usado na reação de transcrição reversa e a eficácia desta reação, em cada amostra foi determinado o nível de expressão (número de cópias) do gene constitutivo: β -actina. RNA foi normalizado com os níveis de *hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase* (HPRT) e a expressão relativa foi calculada com o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ é apresentada como a expressão do gene alvo em uma amostra alvo, em relação a uma amostra de referência, normalizadas para um gene de referência.

Tabela 4: Sequência dos oligonucleotídeos, temperatura de anelamento e número de pares de base.

Gene analisado	Sequência dos oligonucleotídeos	Temperatura de anelamento	Número de pares de base
IFN- β	forward:GGAGATGACGGAGAAGATGC reverse: CCCAGTGCTGGAGAAATTGT	60	102
ROR- γ T	forward:CGCGGAGCAGACACACTTA reverse: CCCTGGACCTCTGTTTTGGC	60	166
T-bet	forward:TGCTTCTAACACACACGTCTTT reverse: TGATCTCTGCGTTCTGGTAGG	57	76
β -actin	forward:GCTGTCCCTGTATGCCTCT reverse: GTCACGCACGATTTCCCTC	57	217

4.9 ISOLAMENTO E PREPARAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ESPINHAL

As medulas espinhais coletadas para a realização da citometria de fluxo foram maceradas em meio RPMI-1640 com 10% de SFB. O macerado foi passado por um filtro de 70 μm (BD Biosciences, Bedford, USA). As células da medula espinhal foram, posteriormente, incubadas com RPMI contendo 2 mg/mL de colagenase D (Roche, Mannheim, Germany) a 37°C por 45 minutos, submetidas a uma constante agitação. As células mononucleares foram separadas por um gradiente de Percoll e submetidos a uma lavagem com solução de PBS, 1% SFB e 0.09% de azida sódica. A seguir as células foram lavadas em solução de ACK para a lise dos eritrócitos, centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos e ressuspensas em PBS, 1% SFB e 0.09% de azida sódica.

4.10 AVALIAÇÃO DE MARCADORES CELULARES POR CITOMETRIA DE FLUXO

As células isoladas da medula espinhal foram incubadas com anticorpos anti-mouse CD11c-FITC, F4/80-PerCP, TLR2-PE, TLR3-PE e TLR4-PE (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA) na concentração de 1:100. Após 30 minutos de incubação a 4°C, as células foram lavadas com tampão de marcação PBS, 1% SFB e 0.09% de azida sódica e tampão de fixação contendo paraformaldeído 1% (BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, USA) e lavada em tampão de permeabilização (BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, USA). Após as marcações extracelulares as células foram submetidas às marcações intracelulares com anticorpos anti-mouse IL-10-PE, Foxp3-FITC e TLR9-PE (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA) na concentração de 1:100. As células foram ressuspensas em 1mL de paraformaldeído (1% em PBS), sendo a captura, leitura e análise feitas em citômetro de fluxo FACSCanto-BD. As análises foram feitas utilizando 10.000 eventos para cada amostra. As células marcadas foram

selecionadas através de tamanho e granulidade e analisadas através do software CellQuest R (BD).

4.11 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS POR ELISA

Homogenatos de medula espinhal foram submetidos à técnica de ELISA para a determinação dos níveis de citocinas e quimiocinas. Foram avaliadas a produção das citocinas IFN- γ , IL-12p40, IL-17A, IL-6, TGF- β e IL-10 e das quimiocinas CCL5 e CCL20. As placas de ELISA foram sensibilizadas com o anticorpo de captura, diluído em tampão específico e incubadas por 18 h a 4°C. Em seguida, lavadas quatro vezes com PBS-Tween e bloqueadas com PBS + Soro Fetal Bovino (10%) por 1 hora. Após este período, as placas foram lavadas novamente quatro vezes e, em seguida, as amostras dos animais utilizados e os padrões de citocinas e quimiocinas foram adicionados. As placas foram então incubadas por 18 horas a 4°C. Após a incubação, as placas foram lavadas quatro vezes, o 2º anticorpo biotinilado e o complexo enzimático acrescentados e a placa incubada por 1 hora à temperatura ambiente. Após a incubação as placas foram lavadas seis vezes e a reação revelada pela adição do substrato contendo TMB (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) e bloqueio com ácido sulfúrico 2N. A leitura foi realizada em leitor de microplacas (SPECTRAMAX 190, Molecular Devices) a 450 nm. As quantidades de citocinas e quimiocinas foram calculadas a partir das curvas-padrão, obtidas pelas diferentes concentrações dos respectivos recombinantes (IFN- γ , IL-12p40, IL-6, TGF- β , IL-10, CCL5 e CCL20, BD Biosciences Pharmigen, San Diego, CA, USA; IL-17A, eBioscience, San Diego, CA, USA).

4.12 COLORAÇÃO POR HEMATOXILINA E EOSINA

As medulas espinhais foram coletadas para análise histológica no 7º, 14º e 21º dia pós indução. Os órgãos foram fixados em solução de paraformaldeído 4% e

posteriormente incluídos em parafina. Após a inclusão, foram realizados cortes transversais de 5 µm de espessura para a coloração em hematoxilina-eosina (HE). O processo de coloração em HE ocorreu com a imersão das lâminas em xilol I, II e III, durante 5 minutos para a desparafinização. Em seguida, estas lâminas foram imersas durante 3 minutos em banhos de álcool absoluto, álcool 95%, álcool 80%, álcool 70% e água destilada por 5 minutos para a hidratação. Após a hidratação, as lâminas foram imersas no corante específico, seguindo as exigências da técnica de HE para a avaliação do infiltrado celular. As lâminas foram imersas em hematoxilina (corante ácido) por dois minutos, em seguida lavadas em água corrente por quatro minutos e imersas em água destilada por 2 minutos. Finalizada esta etapa, as lâminas foram imersas no corante eosina (corante básico), por 1 minuto. Logo após, as lâminas foram desidratadas, sendo imersas na bateria de álcool 70%, álcool 80%, álcool 95% e álcool absoluto e xilol IV, V e VI. Posteriormente, os cortes foram montados com meio de montagem Erv-Mount (EasyPath, Erviegas, São Paulo, SP) entre lâminas e lamínulas. As imagens foram obtidas usando o microscópio Olympus BX51 e os resultados registrados pelo software Image Pro plus (Media Cybernetics TM). Avaliação histológica semiquantitativa para a inflamação foi pontuada como descrito por Xiao e colaboradores (2015): 0 ausência de infiltrado inflamatório; 1 infiltrado celular apenas na área perivascular e perimeninges; 2 infiltrado celular discreto no parênquima; 3 infiltrado celular moderado no parênquima; 4 infiltrado celular intenso no parênquima.

4.13 COLORAÇÃO POR *LUXOL FAST BLUE*

As medulas espinhais foram coletadas para análise da desmielinização no 21º dia pós indução. Os órgãos foram fixados em solução de paraformaldeído 4% e posteriormente incluídos em parafina. Após a inclusão, foram realizados cortes transversais de 10 µm de espessura para a coloração de *luxol fast blue* (LFB) e visualização da desmielinização. O processo de coloração ocorreu com a imersão das lâminas em xilol I, II e III, durante 5 minutos para a desparafinização. Em seguida, estas lâminas foram imersas durante 3 minutos em banhos de álcool

absoluto e álcool 95%. Posteriormente, os cortes permaneceram imersos em LFB durante a noite em estufa a 56°C, em recipiente bem vedado para não evaporar. No dia seguinte foi retirado o excesso de corante com álcool 95% e as lâminas enxaguadas em água destilada. A diferenciação das lâminas foi realizada uma a uma na solução de carbonato de lítio, cerca de 1 minuto para a retirada do excesso de corante. Seguiu-se a diferenciação em álcool 70% agitando-se gentilmente até que a diferença entre substância branca e cinzenta ficasse nítida. A sequência do carbonato de lítio e álcool 70% foi repetida quando necessário, até a substância cinzenta ficar bem clara (acompanhamento ao microscópio). Terminada a diferenciação as lâminas foram coletadas em água destilada. Seguiu-se a coloração pela solução de cresil violeta durante 6 min e a desidratação rapidamente em etanol 95% e absoluto para posterior montagem em Erv-Mount (EasyPath, Erviegas, São Paulo, SP). As imagens foram obtidas usando o microscópio Olympus BX51 e os resultados registrados pelo software Image Pro plus (Media Cybernetics TM). A desmielinização na medula espinhal foi avaliada utilizando um sistema de pontuação descrito por Abdul-Majid e colaboradores (2003): 1 vestígios de desmielinização perivascular ou subapical; 2 desmielinização perivascular ou subapical isolada; 4 desmielinização perivascular ou subapical confluyente; 6 desmielinização confluyente maciça (por exemplo, metade da medula espinhal); 8 desmielinização extensa.

4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA GENISTEÍNA NO CURSO CLÍNICO E NA MASSA CORPORAL DOS ANIMAIS COM EAE

Após a indução do modelo de EAE em camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, utilizando o protocolo de indução com o peptídeo MOG₃₅₋₅₅, tratados ou não com genisteína entre o 2º dia pré indução e o 6º dia pós indução, 8 animais/grupo foram acompanhados diariamente durante 21 dias pós indução para avaliação do curso clínico da EAE e da massa corporal.

Para o grupo controle, não imunizado, durante todo o período avaliado não foi observado nenhum sinal clínico neurológico da EAE. Além disso, os animais desse grupo apresentaram mínimas alterações na massa corporal durante todo o acompanhamento (Figura 7A e B).

O aparecimento dos primeiros sinais clínicos no grupo EAE ocorreu a partir do 11º dia pós indução (d.p.i.), enquanto no grupo GEN os primeiros sinais foram observados a partir do 16º d.p.i.. Além disso, a pontuação do escore clínico do grupo EAE foi estatisticamente maior do que a do grupo GEN, a partir do 12º dia até o último dia avaliado ($p < 0,05$). O pico dos sinais clínicos ocorreu entre o 16º e 17º dias pós indução no grupo EAE, enquanto no grupo GEN após o aparecimento dos sinais no 16º d.p.i., o escore clínico foi crescente até o último dia avaliado, no qual estava presente a maior média observada para este grupo (Figura 7A).

Em paralelo ao agravamento dos sinais clínicos foi observada perda acentuada da massa corporal nos animais do grupo EAE, quando comparados aos animais do grupo GEN, entre o 12º e o 19º dias pós indução ($p < 0,05$) (Figura 7B).

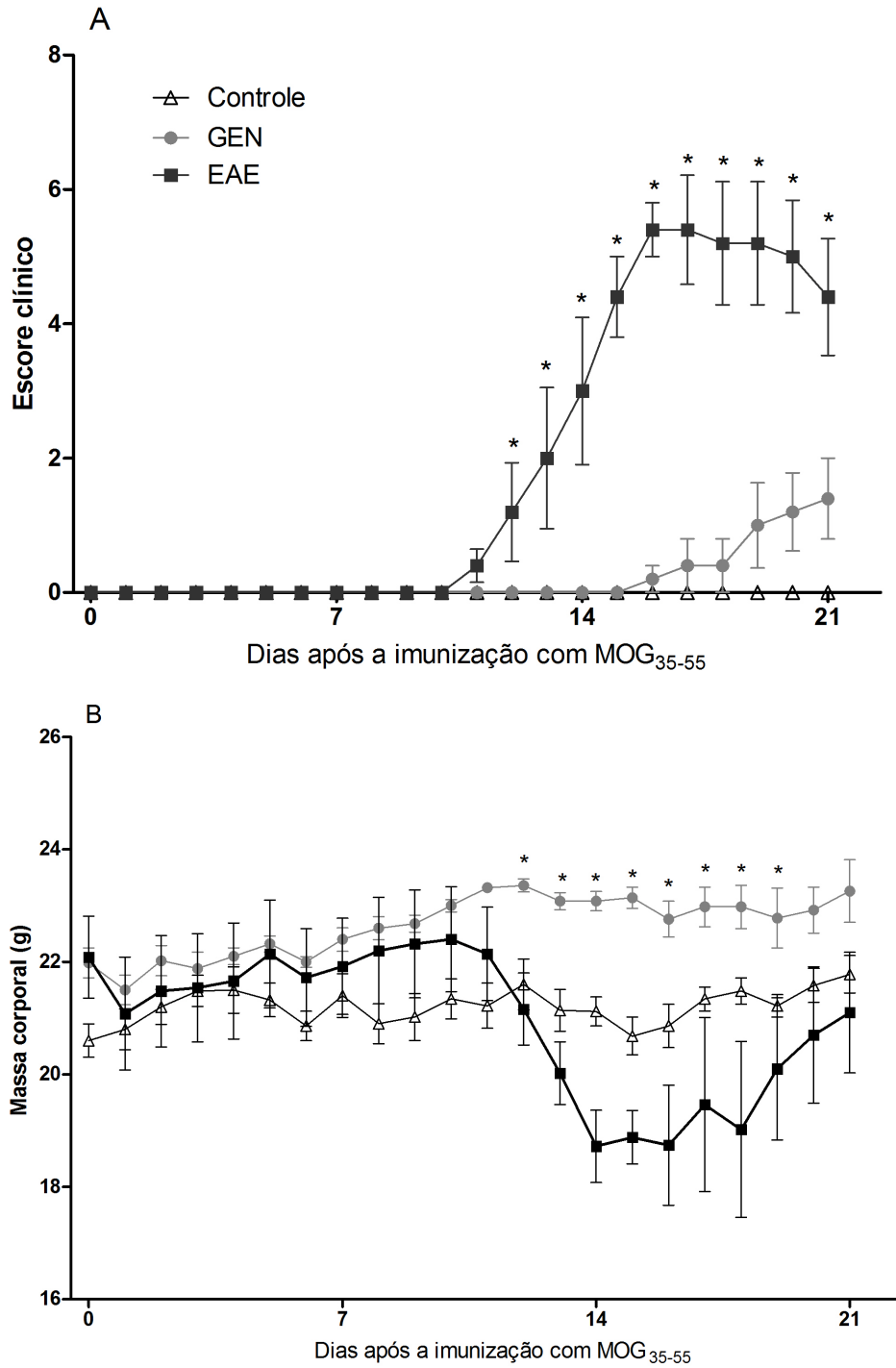


Figura 7: Escore clínico e massa corporal dos camundongos ($n=8$ animais por grupo) imunizados com peptídeo MOG₃₅₋₅₅ tratados ou não com genisteína. O tratamento com genisteína teve início no dia -2 antes da indução até o dia +6 após a indução. A pontuação dos sinais clínicos e a massa corporal foram registrados do dia zero até o 21º dia após a imunização. Controle= grupo não imunizado, EAE= grupo imunizado não tratado, GEN= grupo imunizado tratado com genisteína. Cada ponto representa a média \pm SEM. * $p < 0.05$ de GEN versus EAE.

5.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA GENISTEÍNA NO INFILTRADO INFLAMATÓRIO NA MEDULA ESPINHAL DOS ANIMAIS COM EAE

Após a indução do modelo de EAE em camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, utilizando o protocolo de indução com o peptídeo MOG₃₅₋₅₅, tratados ou não com genisteína entre o 2º dia pré indução e o 6º dia pós indução, a medula espinhal de 3 animais/grupo/dia foi coletada para a avaliação do infiltrado inflamatório através de coloração por hematoxilina e eosina no 7º, 14º e 21º dias pós indução.

Os animais do grupo controle, não imunizado, apresentaram padrão parenquimatoso habitual na medula espinhal, sem a presença de infiltrado celular inflamatório (Figura 8A).

Corroborando o observado na avaliação clínica dos animais, o grupo EAE apresentou infiltrado inflamatório na medula espinhal em todos os pontos avaliados, 7º, 14º e 21º dias pós indução, enquanto os animais do grupo GEN apresentaram infiltrado inflamatório somente no 21º dia pós indução (Figura 8B-G). O infiltrado observado nos animais de ambos os grupos manifestava-se como focos de infiltrado celular inflamatório mononuclear meningeano associado à congestão e ectasia vascular.

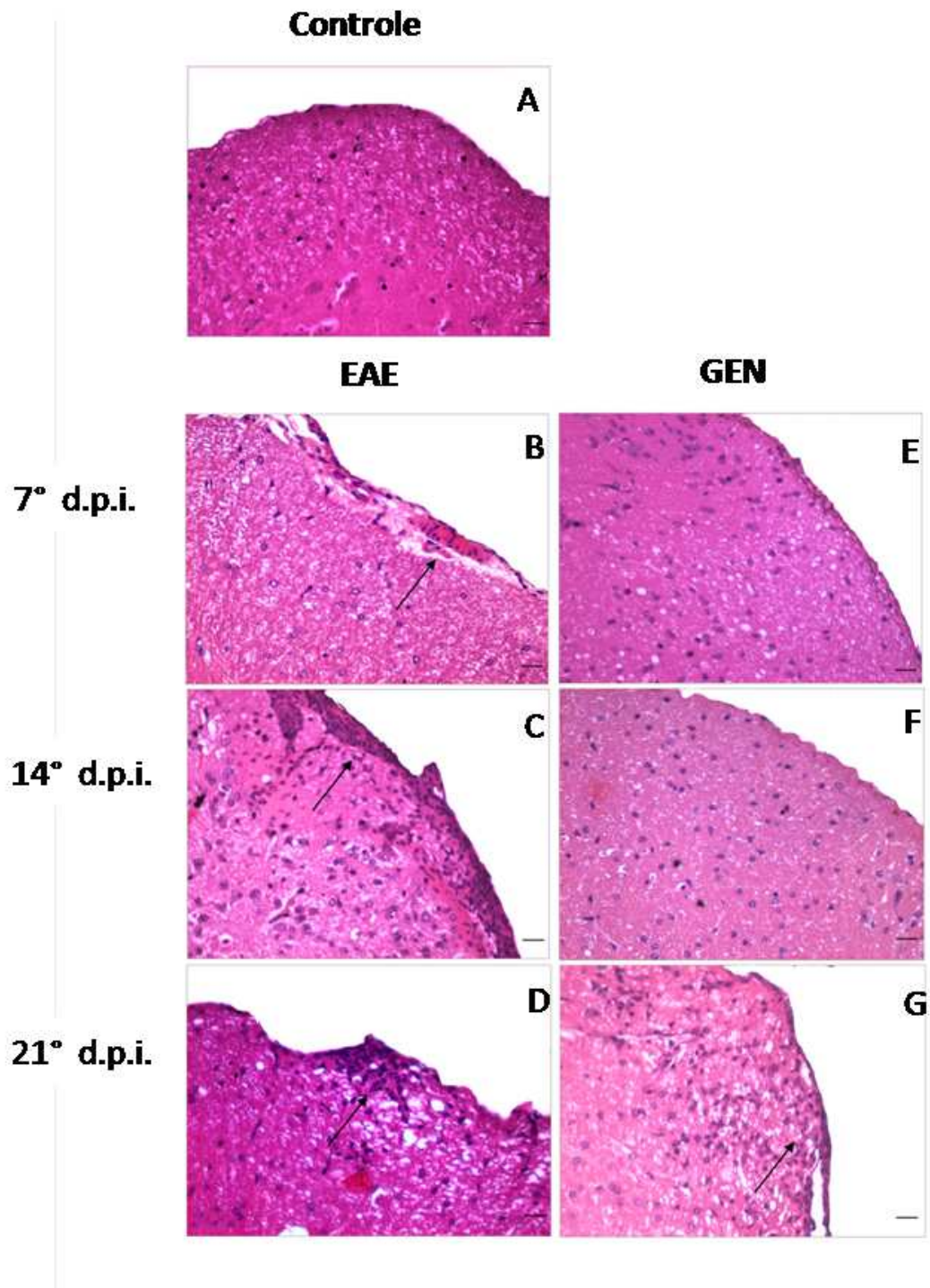


Figura 8: Infiltrado inflamatório. Análise histológica através da coloração de hematoxilina e eosina de cortes transversais de medula espinal de camundongos C57BL/6 imunizados tratados ou não com genisteína (n=3 animais por grupo). As figuras são representativas da análise histológica de cada grupo experimental: Controle= grupo não imunizado, EAE= grupo imunizado não tratado, GEN= grupo imunizado tratado com genisteína, nos dias 7, 14 e 21 pós indução. O grupo controle (A) apresentou histologia normal sem regiões inflamatórias. O grupo EAE (B, C e D) apresentou focos de infiltrado celular inflamatório no 7°, 14° e 21° d. p.i. (seta). O grupo GEN (E, F e G) apresentou focos de infiltrado celular inflamatório somente no 21° d.p.i. (seta). Magnificação de 20x, escala de barra = 50 μ m.

5.3 ESCORE DE INFLAMAÇÃO NA MEDULA ESPINHAL

Após a indução do modelo de EAE em camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, utilizando o protocolo de indução com o peptídeo MOG₃₅₋₅₅, tratados ou não com genisteína entre o 2º dia pré indução e o 6º dia pós indução, a medula espinhal de 3 animais/grupo/dia foi coletada para a avaliação do escore de inflamação no 7º, 14º e 21º dias pós indução.

Os animais do grupo EAE apresentaram infiltrado inflamatório no 7º, 14º e 21º dias pós indução. No 7º dia predominou infiltrado celular discreto apenas na área perivascular e perimeninges. No 14º dia ocorreu o pico do infiltrado inflamatório observado, sendo caracterizado por infiltrado celular moderado na área perivascular, perimeninges e também no parênquima. No 21º dia ocorreu redução do infiltrado inflamatório, predominando o infiltrado celular, principalmente, discreto na área perivascular, perimeninges e no parênquima (Figura 9).

Os animais tratados com genisteína apresentaram infiltrado inflamatório somente no 21º dia pós indução, sendo caracterizado por infiltrado celular discreto na área perivascular e perimeninges (Figura 9).

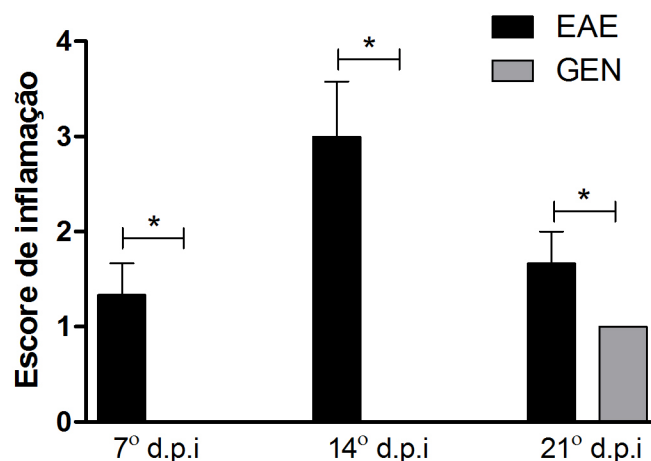


Figura 9: Escore de inflamação. Análise histológica nos dias 7, 14 e 21 pós indução, através da coloração de hematoxilina e eosina de cortes transversais de medula espinhal de camundongos C57BL/6 imunizados tratados ou não com genisteína (n=3 animais por grupo). Grupos experimentais: EAE= grupo imunizado não tratado, GEN= grupo imunizado tratado com genisteína. Cada ponto representa a média±SEM. *p<0.05.

5.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA GENISTEÍNA NA DESMIELINIZAÇÃO DA MEDULA ESPINHAL DOS ANIMAIS COM EAE

Após a indução do modelo de EAE em camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, utilizando o protocolo de indução com o peptídeo MOG₃₅₋₅₅, tratados ou não com genisteína entre o 2º dia pré indução e o 6º dia pós indução, 3 animais/grupo tiveram a medula espinhal coletada para a avaliação da desmielinização através da coloração por *luxol fast blue*, no 21º dia pós indução.

Esta técnica permite a demonstração simultânea da mielina composta por fosfolípidos corada pelo *luxol fast blue* e dos corpos de neurônios corados pelo cresil-violeta. Revela os corpos celulares dos neurônios em rosa-violeta e os axônios revestidos por bainha de mielina em azul. O processo de desmielinização resulta em redução dos fosfolípidos disponíveis para a ligação do *luxol fast blue*.

Os animais do grupo controle, não imunizado, não apresentaram focos de desmielinização na medula espinhal (Figura 10A).

Os animais do grupo EAE, apresentaram maior número e focos mais extensos de desmielinização na medula espinhal, quando comparado aos animais do grupo GEN, no 21º dia pós indução (Figura 10B e C).

Os resultados de desmielinização corroboram aos observados em relação ao infiltrado inflamatório. O processo inflamatório precoce observado no grupo EAE correlaciona-se com o maior número e focos mais extensos de desmielinização na medula espinhal, observados no 21º dia pós indução.

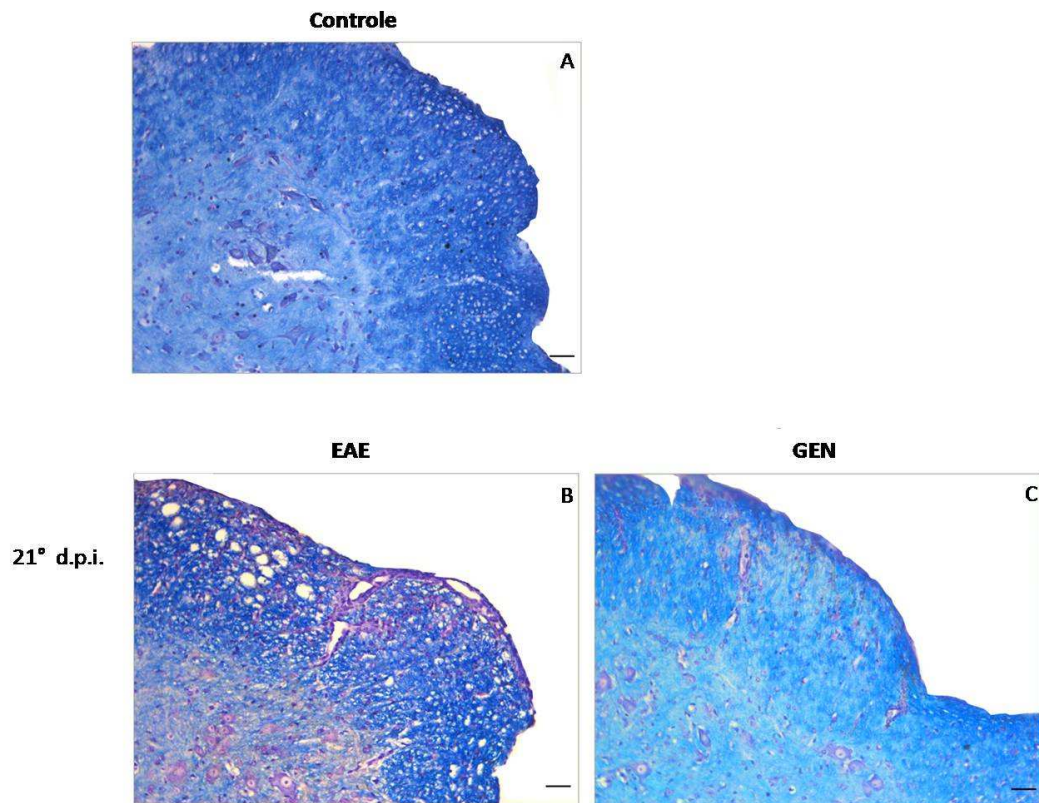


Figura 10: Desmielinização. Análise histológica através da coloração de *luxol fast blue* de cortes transversais de medula espinhal de camundongos C57BL/6 imunizados tratados ou não com genisteína (n=3 animais por grupo). As figuras são representativas da análise histológica de cada grupo experimental: Controle (A) = grupo não imunizado, EAE (B) = grupo imunizado não tratado, GEN (C) = grupo imunizado tratado com genisteína, no dia 21 pós-imunização. O grupo controle apresentou histologia normal sem regiões de desmielinização. O grupo EAE apresentou focos de desmielinização maiores e mais numerosos do que o grupo GEN. Magnificação de 20x, escala de barra = 50 μ m.

5.5 ESCORE DE DESMIELINIZAÇÃO DA MEDULA ESPINHAL

Após a indução do modelo de EAE em camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, utilizando o protocolo de indução com o peptídeo MOG₃₅₋₅₅, tratados ou não com genisteína entre o 2º dia pré indução e o 6º dia pós indução, 3 animais/grupo tiveram a medula espinhal coletada para a avaliação do escore de desmielinização no 21º dia pós indução.

Os animais do grupo EAE, apresentaram escore de desmielinização maior, caracterizado por desmielinização perivascular ou subapical confluyente (Figura 11).

Os animais tratados com genisteína apresentaram menor escore de desmielinização, sendo caracterizado por focos de desmielinização perivascular ou subapical isolados (Figura 11).

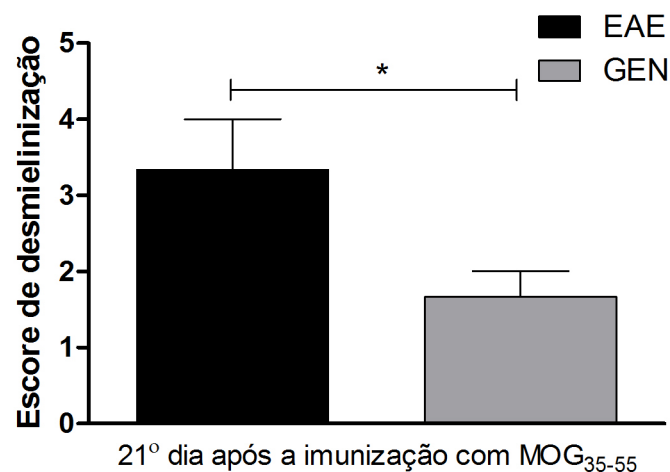


Figura 11: Escore de desmielinização. Análise histológica através da coloração de *luxol fast blue* de cortes transversais de medula espinhal de camundongos C57BL/6 imunizados tratados ou não com genisteína (n=3 animais por grupo). Grupos experimentais: EAE (B) = grupo imunizado não tratado, GEN (C) = grupo imunizado tratado com genisteína, no dia 21 pós-imunização. Cada ponto representa a média±SEM. *p<0.05.

5.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA GENISTEÍNA NA INTENSIDADE MEDIANA DE FLUORESCÊNCIA DE TLR2, TLR3, TLR4 E TLR9 EM CÉLULAS DA MEDULA ESPINHAL POR CITOMETRIA DE FLUXO NO 7º DIA PÓS INDUÇÃO

O estudo da sinalização via TLR tem demonstrado que estes receptores podem contribuir para maior gravidade da EAE, mas também podem promover redução da doença. Desta forma, a influencia da genisteína sobre estes receptores foi avaliada após a indução do modelo em camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, utilizando o protocolo de indução com o peptídeo MOG₃₅₋₅₅, tratados ou não com genisteína, entre o 2º dia pré indução e o 6º dia pós indução. A intensidade mediana de fluorescência dos receptores TLR2, TLR3, TLR4 e TLR9 foi avaliada em células dendríticas (CD11c⁺F4/80⁻) e macrófagos (CD11c⁺F4/80⁺) da medula espinhal, por citometria de fluxo no 7º dia pós indução.

Os resultados obtidos mostram que ocorreu diminuição na intensidade mediana de fluorescência de TLR2 em células dendríticas do grupo GEN, quando comparado ao grupo EAE ($p < 0.05$). Em macrófagos, não houve diferença entre estes grupos (Figura 12A e E).

Em relação à marcação para TLR3 e TLR9 observou-se aumento na intensidade mediana de fluorescência no grupo GEN em relação ao grupo EAE, tanto em macrófagos, quanto em células dendríticas ($p < 0.05$) (Figura 12B, D, F e H).

Foi observado uma tendência de aumento na intensidade mediana de fluorescência para TLR4 no grupo GEN e no grupo EAE, em relação ao grupo controle, tanto em células dendríticas, quanto em macrófagos. Porém, sem significância estatística (Figura 12C e G).

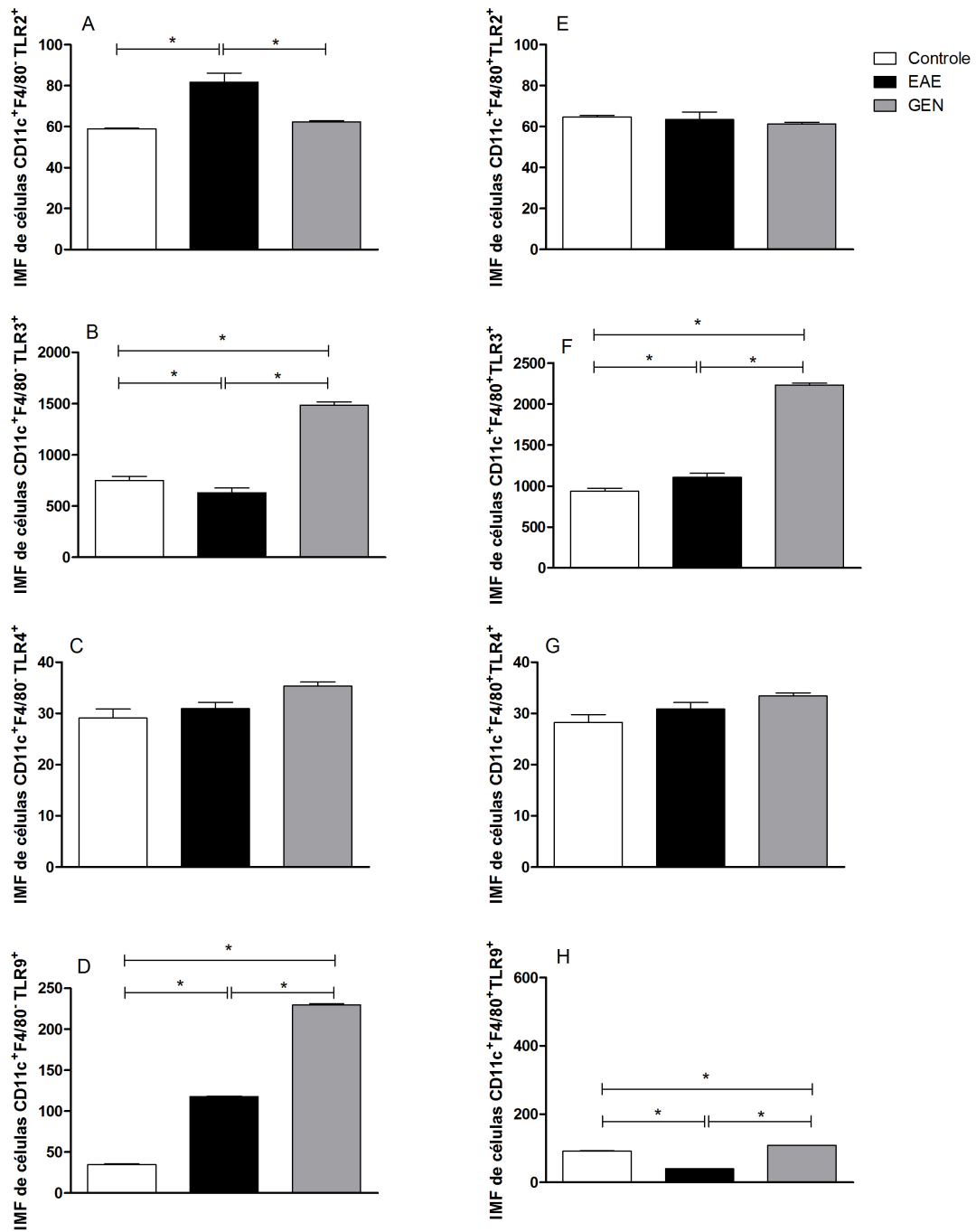


Figura 12: Intensidade mediana de fluorescência de TLR2, TLR3, TLR4 e TLR9 determinada em células dendríticas (A, B, C e D) e macrófagos (E, F, G e H) da medula espinhal por citometria de fluxo no 7º dia pós indução (n=8 animais por grupo). Tratamento com genisteína teve início no dia -2 antes da indução até o dia +6 após a indução. Controle= grupo não imunizado, EAE= grupo imunizado não tratado, GEN= grupo imunizado tratado com genisteína. Cada ponto representa a média±SEM. *p<0.05.

5.7 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA GENISTEÍNA NA EXPRESSÃO RELATIVA DE IFN- β EM CÉLULAS DA MEDULA ESPINHAL POR qRT-PCR NO 7º DIA PÓS INDUÇÃO

IFN- β é um tratamento modificador da doença amplamente utilizado por pacientes com EM. A eficácia do tratamento é avaliada pela diminuição da taxa de recaídas, redução na progressão da incapacidade e redução das lesões inflamatórias no SNC (MARKOWITZ, 2007; RAMGOLAM e MARKOVIC-PLESE, 2010). Além disso, os estudos têm demonstrado que a sinalização via alguns TLRs pode contribuir para o aumento da liberação de IFN- β endógeno, melhorando os sinais clínicos da EAE (TOUIL et al., 2006).

Deste modo, após a indução do modelo de EAE em camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, utilizando o protocolo de indução com o peptídeo MOG₃₅₋₅₅, tratados ou não com genisteína, entre o 2º dia pré indução e o 6º dia pós indução, a expressão relativa de RNAm de IFN- β foi avaliada em células da medula espinhal no 7º dia pós indução.

O grupo GEN apresentou aumento na expressão relativa de RNAm para IFN- β , em relação ao grupo EAE ($p < 0.05$) (Figura 13).

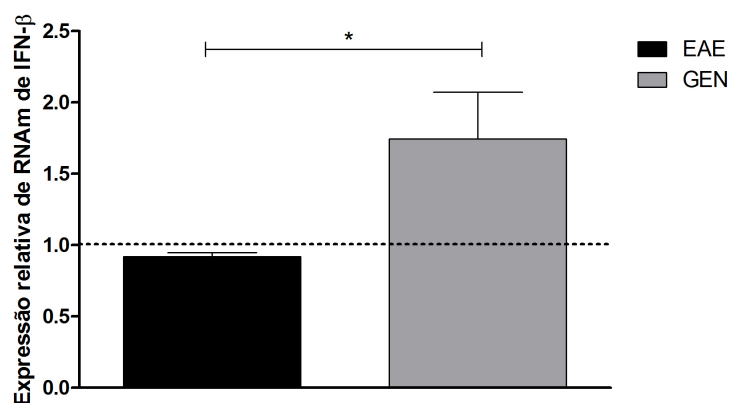


Figura 13: Expressão relativa de RNAm de IFN- β determinada em células da medula espinhal por qRT-PCR no 7º dia pós indução (n=4 animais por grupo). Tratamento com genisteína teve início no dia -2 antes da indução até o dia +6 após a indução. Controle= grupo não imunizado, EAE= grupo imunizado não tratado, GEN= grupo imunizado tratado com genisteína. Cada ponto representa a média \pm SEM. * $p < 0.05$ de GEN *versus* EAE. A linha tracejada corresponde ao grupo controle.

5.8 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA GENISTEÍNA NA CONCENTRAÇÃO DAS QUIMIOCINAS CCL5 E CCL20 NO SOBRENADANTE DO HOMOGENATO DA MEDULA ESPINHAL POR ELISA NO 7º DIA PÓS INDUÇÃO

O influxo de células inflamatórias para o SNC é direcionado por quimiocinas e a produção destas e a expressão de seus receptores pode ser influenciado pelo IFN- β (HOLMAN et al., 2011; CHENG et al., 2015). Por isso, após a indução do modelo de EAE em camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, utilizando o protocolo de indução com o peptídeo MOG₃₅₋₅₅, tratados ou não com genisteína, entre o 2º dia pré indução e o 6º dia pós indução, a concentração das quimiocinas CCL5 e CCL20 foi avaliada no sobrenadante do homogenato da medula espinhal, por ELISA no 7º dia pós indução.

A dosagem de CCL5 na medula espinhal demonstra que a concentração desta quimiocina foi maior no grupo EAE, quando comparado aos grupos controle e GEN ($p < 0.05$) (Figura 14A).

Os níveis da quimiocina CCL20 estavam elevados no grupo EAE em relação ao grupo controle ($p < 0.05$). Foi observado também, tendência a diminuição desta quimiocina no grupo GEN em relação ao grupo EAE, porém sem diferença estatística (Figura 14B).

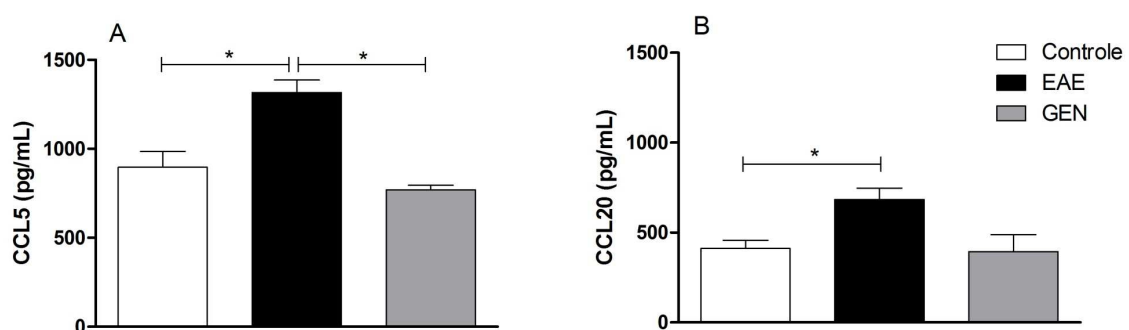


Figura 14: Concentração das quimiocinas CCL5 e CCL20 determinada no sobrenadante do homogenato da medula espinhal por ELISA no 7º dia pós indução (n=6 animais por grupo). Tratamento com genisteína teve início no dia -2 antes da indução até o dia +6 após a indução. Controle= grupo não imunizado, EAE= grupo imunizado não tratado, GEN= grupo imunizado tratado com genisteína. Cada ponto representa a média \pm SEM. * $p < 0.05$.

5.9 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA GENISTEÍNA NA CONCENTRAÇÃO DAS CITOCINAS IL-12p40, IFN- γ , IL-17A, IL-6, TGF- β E IL-10 NO SOBRENADANTE DO HOMOGENATO DA MEDULA ESPINHAL POR ELISA NO 7º DIA PÓS INDUÇÃO

O balanço entre citocinas é muito importante no desenvolvimento da autoimunidade. Enquanto as citocinas pró-inflamatórias atuam contribuindo para o agravamento da doença, as citocinas anti-inflamatórias atuam suprimindo a resposta imunológica autorreativa (SEGAL, 2003; WRAITH, NICOLSON e WHITLEY, 2004; JAGER et al., 2009).

Desta forma, após a indução do modelo de EAE em camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, utilizando o protocolo de indução com o peptídeo MOG₃₅₋₅₅, tratados ou não com genisteína, entre o 2º dia pré indução e o 6º dia pós indução, a concentração das citocinas IL-12p40, IFN- γ , IL-17A, IL-6, TGF- β e IL-10 foi avaliada no homogenato da medula espinhal por ELISA no 7º dia pós indução.

A dosagem de IL-12p40 no homogenato da medula espinhal demonstrou que a concentração desta citocina foi maior no grupo EAE quando comparado ao grupo controle e ao grupo GEN ($p < 0.05$). Os grupos controle e GEN não apresentaram diferença estatística quando comparados entre si (Figura 15A).

A dosagem de IFN- γ no homogenato do macerado de células da medula espinhal foi maior no grupo EAE quando comparado ao grupo controle ($p < 0.05$). Além disso, o grupo GEN não apresentou diferença estatística quando comparado ao grupo controle e ao grupo EAE (Figura 15B).

A indução da EAE elevou a produção de IL-17A por células da medula espinhal nos animais do grupo EAE, em relação ao grupo controle ($p < 0.05$). Enquanto, o grupo GEN não apresentou diferença estatística quando comparado ao grupo controle e ao grupo EAE (Figura 15C).

A dosagem de IL-6 mostrou níveis elevados no grupo EAE em relação ao grupo GEN e ao grupo controle ($p < 0.05$). Os níveis de IL-6 também estavam elevados no grupo GEN em relação ao grupo controle ($p < 0.05$) (Figura 15D).

Os níveis da citocina TGF- β estavam elevados no grupo GEN em relação aos grupos controle e EAE ($p < 0.05$). Enquanto, o grupo EAE apresentou uma

tendência a elevação da produção de TGF- β em relação ao grupo controle, mas sem diferença estatística (Figura 15E).

Os níveis da citocina IL-10 estavam elevados nos grupos EAE e GEN quando comparado ao grupo controle ($p < 0.05$) (Figura 15F).

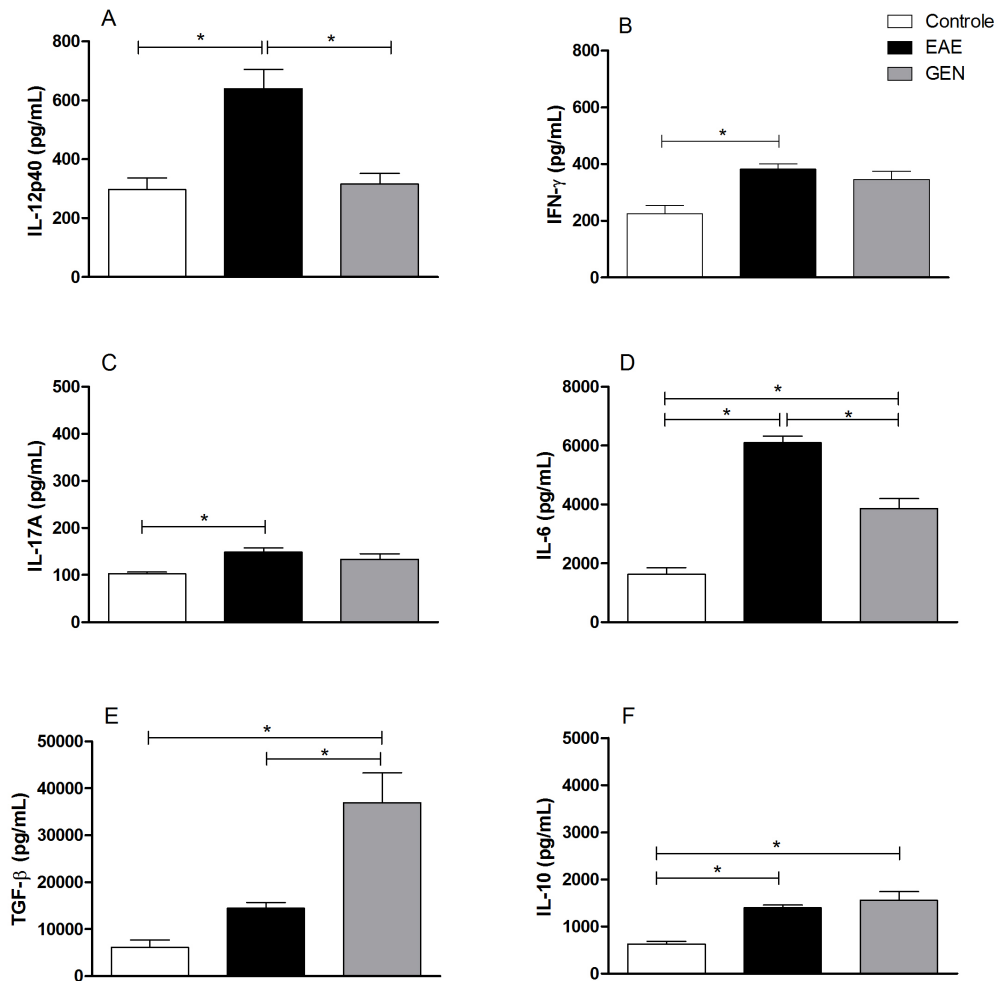


Figura 15: Concentração das citocinas IL-12p40 (A), IFN- γ (B), IL-17A (C), IL-6 (D), TGF- β (E) e IL-10 (F) determinada no sobrenadante do homogenato da medula espinhal por ELISA no 7º dia pós indução (n=6 animais por grupo). Tratamento com genisteína teve início no dia -2 antes da indução até o dia +6 após a indução. Controle= grupo não imunizado, EAE= grupo imunizado não tratado, GEN= grupo imunizado tratado com genisteína. Cada ponto representa a média \pm SEM. * $p < 0.05$.

5.10 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA GENISTEÍNA NA EXPRESSÃO RELATIVA DE RNAm DE T-BET E ROR γ T EM CÉLULAS DA MEDULA ESPINHAL POR qRT-PCR NO 7º DIA PÓS INDUÇÃO

T-bet é um fator de transcrição necessário para a geração de células Th1 produtoras de IFN- γ , enquanto ROR γ t induz a diferenciação de T CD4+ em células Th17 produtoras de IL-17 (IVANOV et al., 2006; SCHULZ et al., 2009), sendo a participação destes fatores no agravamento da EAE demonstrada em vários trabalhos (SEGAL et al., 2003; STROMMES et al., 2008; CHEN e SHANNON, 2013).

Por esse motivo, após a indução do modelo de EAE em camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, utilizando o protocolo de indução com o peptídeo MOG₃₅₋₅₅, tratados ou não com genisteína, entre o 2º dia pr é indução e o 6º dia pós indução, a expressão relativa de RNAm dos fatores de transcrição T-bet e ROR γ T foram avaliadas em células da medula espinhal no 7º dia pós indução.

Os resultados mostram que o grupo GEN apresentou redução na expressão relativa de RNAm para os fatores de transcrição T-bet e ROR γ T, em relação ao grupo EAE ($p < 0.05$) (Figura 16).

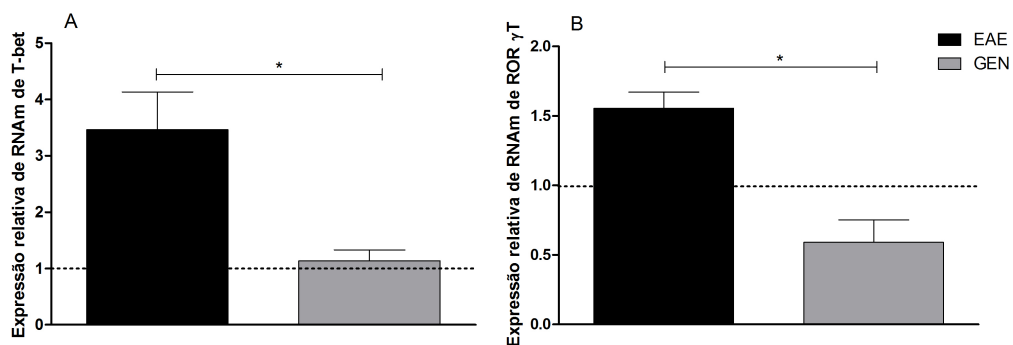


Figura 16: Expressão relativa de RNAm de T-bet (A) e ROR γ T (B) determinada em células da medula espinhal por qRT-PCR no 7º dia pós indução (n=4 animais por grupo). Tratamento com genisteína teve início no dia -2 antes da indução até o dia +6 após a indução. Controle= grupo não imunizado, EAE= grupo imunizado não tratado, GEN= grupo imunizado tratado com genisteína. Cada ponto representa a média \pm SEM. * $p < 0.05$ de GEN versus EAE. A linha tracejada corresponde ao grupo controle.

5.11 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA GENISTEÍNA NA INTENSIDADE MEDIANA DE FLUORESCÊNCIA DE FOXP3 E IL-10 EM CÉLULAS DA MEDULA ESPINHAL POR CITOMETRIA DE FLUXO NO 7º DIA PÓS INDUÇÃO

Enquanto células Th1 e principalmente Th17 são associadas a respostas inflamatórias na EM e na EAE, as células Treg são consideradas células reguladoras negativas, mediadoras da tolerância imunológica, que expressam Foxp3 e produzem a citocina IL-10 (WILLIAMS e RUDENSKY, 2007; VIGNALI et al., 2008).

Deste modo, após a indução do modelo de EAE em camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, utilizando o protocolo de indução com o peptídeo MOG₃₅₋₅₅, tratados ou não com genisteína, entre o 2º dia pré indução e o 6º dia pós indução, a intensidade mediana de fluorescência (IMF) de CD4⁺Foxp3⁺ e CD4⁺L-10⁺ foi avaliada em células da medula espinhal no 7º dia pós indução.

De acordo com os resultados obtidos, os animais do grupo GEN apresentaram aumento na intensidade mediana de fluorescência do fator de transcrição Foxp3 e da citocina IL-10 por células T CD4⁺ da medula espinhal, em relação ao grupo controle e ao grupo EAE ($p < 0.05$) (Figura 17).

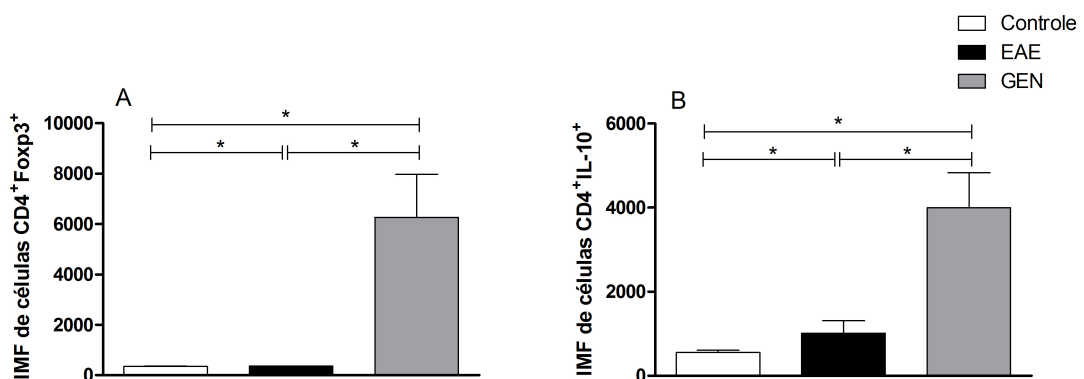


Figura 17: Intensidade mediana de fluorescência de Foxp3 (A) e IL-10 (B) determinada em células da medula espinhal por citometria de fluxo no 7º dia pós indução (n=8 animais por grupo). Tratamento com genisteína teve início no dia -2 antes da indução até o dia +6 após a indução. Controle= grupo não imunizado, EAE= grupo imunizado não tratado, GEN= grupo imunizado tratado com genisteína. Cada ponto representa a média±SEM. * $p < 0.05$.

6 DISCUSSÃO

A encefalomielite autoimune experimental tem sido utilizada para o estudo de aspectos patogênicos, diagnósticos e terapêuticos da esclerose múltipla há décadas (LINDSEY, 2005; MIX, MEYER-RIENECKER e ZETTL, 2008). O modelo animal também tem sido utilizado para compreender melhor e aprimorar para a prática clínica, os mecanismos de ação de medicamentos já estabelecidos para a EM (SCHMIDT et al., 2000; LINKER et al., 2008). Algumas das terapias desenvolvidas no modelo animal que foram aplicadas na EM incluem o acetato de glatiramer, a mitoxantrona e o natalizumab (STEINMAN e ZAMVIL, 2006; ETEMADIFAR et al., 2014; LA MANTIA et al., 2014; RATCHFORD et al., 2014).

Entretanto, os tratamentos atualmente disponíveis frequentemente estão associados a métodos inconvenientes de administração, efeitos adversos significativos e à baixa taxa de adesão dos pacientes (revisto por GLANZ et al., 2014). Estes relatos de eventos adversos e toxicidade, bem como a ineficácia de muitos medicamentos, salientam a necessidade do desenvolvimento de novas terapias (CALABRESI, 2002; ULZHEIMER et al., 2010) e tornam os diversos protocolos de indução da EAE e suas manifestações clínicas, valiosas ferramentas no entendimento e intervenção na EM (AHARONI et al., 2013).

Alguns estudos mostraram que os estrogênios apresentam efeito neuroprotetor via ativação de seus receptores ER α e ER β no SNC (SRIBNICK, RAY e BANIK, 2004; BRANN, et al., 2007) e foram investigados quanto ao seu potencial uso no tratamento da EM (CHAKRABARTI et al., 2014; CHRISTIANSON et al., 2015). Apesar dos resultados positivos, esses hormônios apresentam um significativo número de efeitos secundários deletérios, incluindo aumento do risco de trombose, doença cardíaca, acidente vascular cerebral e efeitos feminilizantes no sexo masculino (NEF e PARADA, 2000; PAGANINI-HILL, 2001). Por isso, a genisteína, um fitoestrógeno presente na soja e estruturalmente semelhante a moduladores seletivos de estrogênio, vêm sendo estudada como potencial substituto no tratamento de doenças neurodegenerativas (BANG et al., 2004; DING et al., 2011; SHI et al., 2012).

Além do efeito neuroprotetor das dietas ricas em soja, que apresentam grande quantidade de fitoestrógenos, alguns destes compostos apresentaram efeitos benéficos também em modelos *in vivo* de autoimunidade (MOHAMMADSHAHI et al., 2013; JAHROMI et al., 2014; RAZEGHI JAHROMI et al., 2014). Além disso, hábitos alimentares que incluíam a ingestão de soja foram associados ao risco reduzido de desenvolvimento da EM (JAHROMI et al., 2012). Portanto, a genisteína, um agonista do receptor de estrogênio beta e potente antioxidante, pode representar uma alternativa ao estrogênio no tratamento de doenças neurodegenerativas e o seu uso pode ser justificado pelo menor risco de efeitos adversos associados a esse fitoestrógeno.

A justificativa associada à redução dos riscos origina-se de estudos epidemiológicos mostrando que a EM têm maior incidência em mulheres e apesar dos receptores de estrogênio estarem presentes em indivíduos de ambos os sexos, a expressão e a transcrição de ER em animais é relativamente superior em fêmeas, quando comparado aos machos. Além disso, o declínio da expressão de ER relacionado com a idade é relativamente maior em camundongos machos, por isso estariam menos sujeitos a possíveis efeitos negativos do uso desses compostos (SHARMA e THAKUR 2006; THAKUR e SHARMA, 2006).

Outros estudos mostram que o efeito de isoflavonas, tal como a genisteína, no sexo masculino não têm sido prejudicial. Quando utilizadas como tratamento no câncer de próstata, foram capazes de retardar o desenvolvimento e inibir a formação de metástase, sem promover efeitos adversos significativos (MESSINA, 2004; POLLARD e SUCKOW, 2006; LAKSHMAN et al., 2008). Além disso, foi observado que o elevado consumo de isoflavonas na dieta, não está associado a efeitos feminilizantes em homens (MESSINA, 2010).

Nosso grupo estuda o modelo de EAE há aproximadamente 9 anos. Os estudos anteriores utilizando a genisteína na terapia da EAE mostraram seu potencial valor terapêutico para a EM. O tratamento de camundongos C57BL/6 com EAE, após o aparecimento dos primeiros sinais clínicos, resultou em melhora da evolução da doença e redução na adesão e rolamento de leucócitos na microvasculatura, sugerindo que a genisteína atua sobre a interação entre as células inflamatórias e o endotélio cerebral. Além disso, o tratamento promoveu redução de

citocinas pró-inflamatórias IFN- γ , IL-12 e TNF- α e aumentou a citocina reguladora IL-10 (DE PAULA et al., 2008).

Posteriormente, outro estudo do nosso grupo mostrou que análogos da genisteína promoviam a melhora dos sinais clínicos da doença e modulavam a resposta imunológica, reduzindo as citocinas pró-inflamatórias IFN- γ , IL-17 e IL-6 e a porcentagem de células CD4⁺IL-17⁺ no cérebro, no 21° após a indução da doença. Concomitantemente, ocorreu aumento da porcentagem de células reguladoras CD4⁺CTLA-4⁺, CD4⁺Foxp3⁺, CD4⁺IL-10⁺ e foi observado também redução do infiltrado inflamatório e da desmielinização nos animais tratados (CASTRO et al., 2012).

No entanto, o mecanismo através do qual a genisteína é capaz de modular o sistema imunológico e promover melhora nos sinais clínicos da EAE permanece pouco compreendido. Os trabalhos realizados até o momento utilizavam um protocolo de tratamento após o aparecimento dos sinais clínicos da doença e não abordavam a resposta imunológica inata. Além disso, os resultados obtidos correspondiam a pontos avançados da resposta imunológica, tal como o 21° após a indução, enquanto os efeitos sobre o início da doença permaneciam desconhecidos.

Neste contexto, o atual trabalho busca compreender a modulação da genisteína sobre a resposta imunológica através dos receptores *toll like* expressos em uma variedade de tipos celulares, especialmente as células do sistema imune inato, tais como as células dendríticas e os macrófagos. A sinalização via TLR em células imunes inatas, indiretamente, pode promover a diferenciação e a proliferação de células T através da maturação de células dendríticas e da produção de citocinas reguladoras (revisto por DE NARDO et al., 2015).

Para este estudo, utilizamos um tratamento anterior ao aparecimento dos sinais clínicos da EAE, iniciado 2 dias antes da imunização com o MOG₃₅₋₅₅ e prolongado até o 6° dia após a indução. Os principais parâmetros foram avaliados no 7° dia após a indução. No protocolo de imunização utilizado, nesse tempo de análise, apesar da ausência de sinais clínicos, já é possível observar o infiltrado inflamatório, o aumento de quimiocinas e de citocinas pró e anti-inflamatórias no SNC. Esses dados foram mostrados em um trabalho anterior do nosso grupo que investigou a cinética da doença avaliando os parâmetros no 7°, 10°, 14°, 21° e 58° dias após a indução (DIAS et al., 2015).

Inicialmente, o presente trabalho mostrou que o tratamento da EAE com genisteína, foi capaz de atrasar o aparecimento dos sinais clínicos e de reduzir a gravidade da doença, reforçando o papel neuroprotetor desse fitoestrógeno. Os animais imunizados e não tratados apresentaram escore clínico a partir do 11º dia, enquanto no grupo tratado, os primeiros sinais foram observados somente a partir do 16º dia pós indução. Além disso, a média da pontuação máxima do escore clínico permaneceu significativamente menor no grupo tratado. Estes dados corroboram o encontrado em estudos anteriores que mostraram que o tratamento com genisteína é capaz de melhorar significativamente a evolução clínica da EAE (DE PAULA et al., 2008; CASTRO et al., 2012).

Muito se tem discutido sobre o papel das infecções como importante fator ambiental associado às exacerbações da EM, bem como de outras doenças autoimunes (revisito por CHRISTEN e VON HERRATH, 2005; CHERVONSKY, 2010). Os estudos mostram que a imunidade inata desempenha um papel importante tanto na iniciação, quanto na progressão da EM, ativando a função efetora das células T e B de forma semelhante ao processo no qual um agente patogênico está envolvido (revisito por WEINER et al., 2008; GANDHI, LARONI e WEINER, 2010). A participação dos TLRs e de outros estímulos do sistema imune inato que estão presentes após uma infecção, fornecem sinais que podem resultar em quebra da tolerância e no desenvolvimento da autoimunidade (OLSON, LUDOVIC CROXFORD e MILLER, 2004).

A estes receptores têm sido atribuído papéis importantes na patologia de doenças autoimunes, tais como a EAE e a EM (MARTA et al., 2008; ZHANG, ZHANG e SCHLUESENER, 2009; REYNOLDS, 2012). A sinalização via TLR2 e TLR4 induz a produção de IL-1, IL-6 e IL-12, que induzem a diferenciação de células T *naive* em células Th1 e Th17. Enquanto a sinalização via TLR3, TLR7 e/ou TLR9 pode levar à produção de IFN- β , que ativa células T supressoras e inibe a produção de IL-17 e IL-23 (revisito por MIRANDA-HERNANDEZ e BAXTER, 2013). Diante dessas informações, no presente trabalho foi avaliada a intensidade mediana de fluorescência dos receptores TLR2, TLR3, TLR4 e TLR9 em macrófagos (CD11c⁺F4/80⁺) e em células dendríticas (CD11c⁺F4/80⁻), presentes na medula espinhal.

Os resultados mostraram que ocorreu redução na expressão de TLR2 nas células dendríticas dos animais tratados com genisteína, quando comparado ao grupo EAE. Em relação ao TLR4, não foi observado diferença significativa entre esses grupos. No entanto, em relação a TLR3 e TLR9 ocorreu aumento na expressão nos animais tratados, tanto em células dendríticas, quanto em macrófagos, quando comparado ao grupo EAE. Os resultados sugerem que a modulação de TLRs pela genisteína contribui para a redução na gravidade da doença via sinalização de receptores que levam à produção de IFN- β .

A sinalização via TLR3 induz a ativação de NF- κ B por meio do adaptador TRIF, o que aumenta a produção de interferons do tipo I (KAWAI e AKIRA, 2010). Foi mostrado também que astrócitos humanos aumentam a produção de citocinas anti-inflamatórias, tais como IL10 e regulam negativamente citocinas pró-inflamatórias tais como IL-12(p40) e IL-23, em resposta a sinalização de TLR3 (BSIBSI et al., 2002). TLR3 desencadeia resposta neuroprotetora em astrócitos, induz o crescimento de axônios e de células progenitoras neurais (WOLF, AMOUZEGAR e SWANBORG, 2007). Além disso, um estudo demonstrou que o tratamento com o ligante de TLR3, *polyinosinic-polycytidylic acid* (poli I:C), foi capaz de suprimir a EAE por promover a produção de IFN- β endógeno (TOUIL et al., 2006).

No trabalho de Touil e colaboradores (2006), a EAE foi induzida em camundongos SJL/J imunizados com PLP₁₃₉₋₁₅₁. Os animais foram tratados por via intraperitoneal com poly I:C que é um agonista de TLR3 e potente indutor de IFN- β . O tratamento foi capaz de suprimir o desenvolvimento da EAE e essa supressão foi associada ao aumento dos níveis de IFN- β . Além disso, o infiltrado inflamatório e a desmielinização foram significativamente menores no grupo tratado. A cultura dos esplenócitos desses animais mostrou ainda elevados níveis de CCL2. Essa quimiocina promove a diferenciação de células Th2 e está envolvida na indução de tolerância imunológica pela administração de antígenos de mielina (KENNEDY et al., 1998).

Posteriormente, um estudo induziu EAE em camundongos C57BL/6 com MOG₃₅₋₅₅ e os animais foram tratados por injeção intratecal com poly I:C a partir do aparecimento do primeiro sinal clínico da doença e eutanaziados 6, 18 e 72 horas após. O tratamento aumentou a produção de IFN- β por células localizadas nas

meninges e no plexo coróide, bem como aumentou a expressão por células da micróglia parenquimatosa. Ocorreu redução do agravamento da doença durante o tempo em que o IFN- β foi expresso. Em contraste, não houve qualquer efeito terapêutico sobre a EAE em camundongos IFN- $\beta^{-/-}$ tratados com poly I:C (KHOROOSHI et al., 2015).

TLR9 é expresso em monócitos, macrófagos, células dendríticas plasmocitóides (DCp) e células B. A produção de IFN- β mediada pela sinalização de TLR9 foi demonstrada em infecções por *Staphylococcus aureus* (PARKER e PRINCE, 2012), por vírus Influenza A (HAN et al., 2014) e por enterovírus (HSIAO et al., 2014). Em outro estudo, células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes com EM foram tratadas com CpG-A, agonista de TLR9, para induzir a produção de IFN- β . Após ativação com superantígeno e concomitante cultura com APCs ativadas por CD40L, as células apresentaram redução na produção de IFN- γ e aumento de IL-10 (MEYERS et al., 2006).

Em outro trabalho, a EAE foi induzida em C57BL/6 com MOG₃₅₋₅₅ e os animais tratados com CpG-A antes da imunização com o peptídeo. Os camundongos tratados apresentaram uma doença menos grave, acompanhada de redução na proliferação de células T encefalitogênicas e diminuição no infiltrado para o SNC (LONGHINI et al., 2014). Foi demonstrado também que camundongos TLR9 $^{-/-}$ apresentaram maior gravidade na EAE, quando comparado a camundongos selvagens. Além disso, ocorreu maior produção de IL-6 por esplenócitos de animais TLR9 $^{-/-}$ (MARTA et al., 2008).

Paralelo aos resultados anteriores apresentados, o presente estudo mostrou aumento na expressão relativa de RNAm para IFN- β em células da medula espinhal, no grupo tratado com genisteína. O IFN- β é um tratamento padrão da EM e tem ação benéfica também sobre a EAE. Em pacientes com EM remitente-recorrente, o IFN- β é capaz de suprimir a resposta autoimune através da redução da inflamação mediada por células T, pela redução na apresentação de antígenos e pela estabilização da barreira hemato-encefálica (MARKOWITZ, 2007). IFN- β também suprime a resposta de células Th17 na EM e na EAE, através da regulação da expressão de citocinas, tais como IL-4, IL-10 e IL-27 (GUO, CHANG e CHENG, 2008; RAMGOLAM e MARKOVIC-PLESE, 2010).

Estudos mostraram que o IFN- β também inibe a ativação de células T através da supressão de MHC II, de moléculas co-estimuladoras e de moléculas de adesão celular em APCs (PRINZ et al., 2008). O tratamento com IFN- β expande células Treg por induzir a expressão do ligante do receptor do fator de necrose tumoral (TNF) induzido por glicocorticóides (GITRL) em pacientes com esclerose múltipla (CHEN et al., 2012). Além disso, suprime a expressão de VLA4 em células T efetoras reduzindo o tráfego de células T para o SNC (MURARO et al., 2000).

O tratamento com IFN- β , de células T cultivadas sob condições polarizantes para Th17, resultaram em reduzida produção de IL-17 e no aumento da produção de IL-10. Mostraram também que o IFN- β induz a produção de IL-10 por células T antígeno específicas derivadas de camundongos imunizados. Além disso, o tratamento com IFN- β foi capaz de suprimir a atividade encefalitogênica de células T específicas para a mielina e melhorar os sintomas clínicos da EAE em um modelo de transferência adotiva. Sugerindo que o IFN- β pode induzir as células T antígeno-específicas a produzir IL-10, que por sua vez regula negativamente a resposta inflamatória e autoimune mediada por células Th17 (ZHANG et al., 2011).

Durante a EAE, células T periféricas reativas para a mielina são primadas nos órgãos linfóides secundários, proliferam e migram para o SNC onde são reativadas devido à apresentação de antígenos mielínicos endógenos. O processo inflamatório resultante promove a desmielinização no SNC (LOPES PINHEIRO et al., 2016). Para avaliar o efeito do tratamento com genisteína sobre o infiltrado inflamatório e a desmielinização no SNC, foi realizada a avaliação histológica da medula espinhal. Os resultados mostraram ausência de infiltrado inflamatório no grupo de animais tratados no 7° e 14°, além de menor infiltrado e menor desmielinização no 21° dia pós-indução. Estes dados reforçam que o tratamento com genisteína é capaz de reduzir desordens neuroinflamatórias provocadas pelo influxo de células no SNC, o que pode contribuir para a redução na severidade da doença.

Na fase de indução da EAE, as células T autorreativas CD4⁺ específicas para a mielina são consideradas responsáveis por conduzir o processo inflamatório, uma vez que seu papel na fase de indução é predominante (SOSPEDRA e MARTIN, 2005). As células T se infiltram no SNC e normalmente aumentam a expressão de T-bet, o maior regulador da diferenciação para Th1 (BETTELLI et al., 2004). Por sua

vez, a diferenciação da célula T é influenciada pelo microambiente de citocinas. A citocina IL-12 estimula a diferenciação de células Th *naive* em células Th1 (SCHULZ et al., 2009). O subconjunto de células Th1 efetoras é responsável pela produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como o IFN- γ , tradicionalmente relacionado na patogênese da EAE (SEGAL, 2003).

No presente trabalho, o tratamento com genisteína foi capaz de reduzir a produção da citocina IL-12p40 e a expressão relativa de RNAm do fator de transcrição T-bet na medula espinhal. Este resultado está de acordo com o encontrado em outro trabalho que mostra redução nos níveis de IL-12 no SNC de camundongos com EAE, tratados com genisteína (DE PAULA et al., 2008). Outro estudo mostrou que a supressão de T-bet através da administração terapêutica de um RNA de interferência específico para T-bet, melhorou significativamente o curso clínico da EAE e limitou a diferenciação de células Th1 autorreativas (GOCKE et al., 2007). Da mesma forma, camundongos deficientes em T-bet são resistentes à doença (BETTELLI et al., 2004).

Células T *helper* produtoras de IL-17 são consideradas a principal população de células T patogênicas na EAE (KOMIYAMA et al., 2006; KEBIR et al., 2007; JAGER et al., 2009). A diferenciação de T CD4⁺ em células Th17 é induzida pelo fator de transcrição ROR γ t (IVANOV et al., 2006). Camundongos transgênicos que superexpressavam ROR γ t apresentaram uma resposta Th17 anti-MOG mais robusta e desenvolveram uma forma mais grave de EAE, quando comparado aos camundongos do tipo selvagem (MARTINEZ et al., 2014), enquanto camundongos deficientes em ROR γ T apresentavam a gravidade da EAE reduzida (CHEN e SHANNON, 2013). Além disso, esta população de células T se desenvolve na presença de TGF- β e IL-6 e depende de IL-23 para seu crescimento e sobrevivência (MANGAN et al., 2006).

No presente estudo, foi observado que o tratamento com genisteína foi capaz de reduzir também a expressão relativa de RNAm do fator de transcrição ROR γ T por células da medula espinhal, sugerindo que a genisteína é capaz de melhorar os sinais clínicos da doença por reduzir os fatores de diferenciação tanto de células Th1, quanto de Th17. Paralelamente, a produção das citocinas IFN- γ e IL-17A, no 7º dia pós indução, sugere uma tendência à redução no grupo GEN comparado ao grupo EAE, embora sem significância estatística.

A avaliação da expressão relativa de RNAm dos fatores de transcrição e da produção das citocinas em um mesmo momento do desenvolvimento da doença pode ser a causa da ausência de diferença entre os grupos, em relação ao nível das citocinas. Possivelmente, uma avaliação em pontos posteriores resultaria também em diferença na produção de IFN- γ e IL-17A entre os grupos, visto que o infiltrado inflamatório no grupo EAE foi observado no 14^o e 21^o dias após a indução e no grupo tratado com genisteína o infiltrado só foi observado no 21^o dia após a indução.

A migração de células T ativadas para o SNC é direcionada por quimiocinas (HOLMAN et al., 2011) e mediada por moléculas de adesão (ENGELHARDT e RANSOHOFF, 2012). A expressão constitutiva da quimiocina CCL20 no plexo coróide é considerada uma ponte de ligação para as células T entrarem no SNC não inflamado (AXTELL e STEINMAN, 2009; REBOLDI et al., 2009). Foi observado *in vitro*, que células Th17 podem preferencialmente expressar CCR6, o receptor para a quimiocina CCL20 (HIROTA et al., 2007; SINGH et al., 2008; REBOLDI et al., 2009). Com base na expressão preferencial de CCR6 por células Th17 e a expressão constitutiva de CCL20 no plexo coróide, foi proposto que CCR6 pode desempenhar um papel crítico na entrada das células Th17 no SNC na EAE e na indução da doença (REBOLDI et al., 2009).

Por outro lado, os ligantes de CCR5 que incluem CCL3, CCL4 e CCL5 também são detectados em lesões ativas da EM. Sendo os níveis de CXCL10, CCL3 e CCL5 considerados um reflexo de respostas do tipo Th1. Portanto, as alterações na expressão destas quimiocinas no líquido cefalorraquidiano são aceitas como representativas da infiltração de células Th1 no SNC (NAKAJIMA et al., 2004). O aumento da expressão de CCL5 foi detectado no líquido cefalorraquidiano de pacientes com EM e no SNC de camundongos com EAE (SORENSEN et al., 1999; FURLAN et al., 2005; UBOGU, COSSOY e RANSOHOFF, 2006; SZCZUCINSKI e LOSY, 2007). Por conseguinte, a maior expressão de receptores de CCL5 em células imunocompetentes correlacionou-se com a gravidade da EAE (NAVRATILOVA, 2006; ELTAYEB et al., 2007), enquanto antagonistas de CCL5 foram eficazes no controle dos sintomas da doença (PROUDFOOT, DE SOUZA e MUZIO, 2008).

No presente trabalho, foi avaliada a produção das quimiocinas CCL5 e CCL20 por células da medula espinhal. O grupo tratado com genisteína apresentou

redução significativa na produção da quimiocina CCL5 e mostrou, ainda, uma tendência à redução na produção de CCL20, embora não tenha ocorrido diferença estatística. Estes dados sugerem que a redução das quimiocinas pode ter contribuído para a redução do infiltrado inflamatório no SNC observado nos cortes histológicos da medula espinhal dos animais tratados com genisteína.

O estudo de Cheng e colaboradores (2015) investigou os efeitos imunomoduladores do tratamento com IFN- β na EAE, sobre a produção de quimiocinas e a expressão de seus receptores. Os resultados mostraram que o IFN- β reduziu a gravidade da doença e diminuiu os níveis de CCR2, CCR4, CCR5, CCR6 e CXCR3 no SNC. Isto foi associado com o menor número de células Th1 e Th17 que expressavam estes receptores de quimiocinas. Além disso, os níveis de seus ligantes CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL20, CCL22 e CXCL10 também estavam reduzidos. Foi observado, concomitantemente, redução do infiltrado inflamatório e da desmielinização no SNC. Sugerindo que o IFN- β reduz a produção das quimiocinas e de seus receptores expressos por células Th1 e Th17 encefalitogênicas, diminuindo assim, a sua migração para o SNC.

O estudo do papel da genisteína na modulação da resposta imune também foi realizado em um trabalho que comparou os efeitos da administração dessa isoflavona na EAE, em fases precoce e tardia da doença. Camundongos C57BL/6 foram tratados por gavagem com 300 mg/kg por dia de genisteína, logo após o aparecimento do primeiro sintoma clínico ou 30 dias após a indução da doença por um período de dez dias. Vinte quatro horas após a última administração os animais foram sacrificados (RAZEGHI JAHROMI et al., 2014).

A administração de genisteína após o estabelecimento da EAE, não reverteu a gravidade da doença. No entanto, o tratamento no início reduziu os sinais clínicos e a desmielinização na medula espinhal, além de suprimir a produção de IFN- γ e aumentar a secreção de IL-10 no cérebro. Sugerindo que a terapia oral com genisteína pode apenas reduzir a gravidade da EAE se iniciada nas fases iniciais da doença (RAZEGHI JAHROMI et al., 2014).

O efeito protetor e terapêutico da daidzeína, outro fitoestrógeno obtido da soja, também foi mostrado. Para avaliação do efeito protetor, os camundongos receberam por gavagem 20 mg/kg por dia de daidzeína a partir de 21 dias antes da indução e durante 21 dias após a indução da EAE. Para avaliar o efeito terapêutico,

os camundongos receberam por gavagem 300 mg/kg de daidzeína durante 10 dias a partir do aparecimento dos primeiros sinais clínicos. Um dia após a última administração, os camundongos foram sacrificados (RAZEGHI JAHROMI et al., 2014).

A baixa dose antes da indução não impediu o desenvolvimento da doença. No entanto, o tratamento com a dose elevada após o início da doença reduziu os níveis de IFN- γ e IL-12, aumentou a produção de IL-10 e suprimiu a proliferação de linfócitos. Além disso, reduziu a extensão da desmielinização e a gravidade da doença (RAZEGHI JAHROMI et al., 2014). Estes estudos reforçam o papel neuroprotetor dos fitoestrógenos, mas também mostram a importância da compreensão da melhor dose a ser utilizada e do melhor período da doença para o uso do tratamento ser eficaz.

Continuando o presente estudo, os resultados obtidos mostraram, redução na produção da citocina IL-6, concomitante ao aumento na produção de TGF- β nos animais tratados com genisteína. Além disso, aumentou a intensidade mediana de fluorescência de células CD4⁺Foxp3⁺ e de células CD4⁺IL-10⁺. Sugerindo um microambiente favorável a diferenciação de células T reguladoras no SNC. Enquanto células Th17 são mediadoras das respostas inflamatórias, as células Treg são um tipo de células imunes reguladoras negativas e são responsáveis por mediar a tolerância imunológica (WRAITH, NICOLSON e WHITLEY, 2004).

Foxp3 é o principal fator de transcrição que controla o desenvolvimento e a função das células T reguladoras. As células Treg também podem ser induzidas na periferia por TGF- β ou pelo estímulo contínuo de células dendríticas ou tolerogênicas por antígenos específicos (SHEVACH, 2009; ZHOU et al., 2011; GOLDSTEIN et al., 2013). A supressão mediada por células Treg ocorre devido ao contato direto célula-célula, pela indução de citocinas inibidoras, tal como a IL-10, diminuição da proliferação de células T efetoras e inibição da liberação de citocinas inflamatórias, levando à redução da inflamação e a manutenção de autotolerância (VIGNALI, COLLISON e WORKMAN, 2008).

Como várias doenças autoimunes caracterizam-se por uma redução na população de células Treg e ruptura na função destas, estes processos podem estar relacionados com a quebra da tolerância e a patogênese nessas doenças (VIGNALI, COLLISON e WORKMAN, 2008). Na EAE, um aumento *in situ* na população de

células Treg ou a transferência passiva de células Tregs antígeno-específicas, geradas *in vitro*, pode atenuar a indução e a progressão da doença (MATSUSHITA et al., 2010).

Foxp3 regula a função das células T controlando a transcrição de vários genes, incluindo CTLA-4, IL-2, IFN- γ e regula a função das células Treg (WILLIAMS e RUDENSKY, 2007). TGF- β estimula as células T CD4 a aumentar a expressão de Foxp3 e a expressão constitutiva de Foxp3 é necessária para a função supressora estável das células Treg (APOSTOLOU et al., 2008; CUROTTO DE LAFAILLE e LAFAILLE, 2009).

Ocorreu aumento na expressão de IL-10 por células CD4⁺ no grupo tratado. Paralelamente, foi observado uma tendência ao aumento da produção da citocina IL-10, no 7º dia pós indução. O ambiente regulador neste momento, também pode ser sugerido pelos níveis elevados de TGF- β encontrados. Esses dados sugerem ainda que o tratamento com genisteína e o consequente aumento de IFN- β , podem ser responsáveis pelo estabelecimento de um perfil regulador, que pode ser relacionado ao atraso no aparecimento dos sintomas e à diminuição da pontuação do escore clínico na EAE.

Um estudo prévio mostrou que o tratamento combinado do IFN- β e de um agente neuroprotetor ligante de ER β , durante a EAE, atenuou significativamente a gravidade da doença, preservou a densidade axonal na medula espinhal, reduziu a inflamação no SNC e reduziu a expressão de VLA-4 por células T CD4⁺. Sugerindo que o tratamento concomitante com IFN- β e um ligante de ER β pode resultar em efeitos complexos e mais eficazes, que não seriam alcançados com base apenas no uso da monoterapia (DU et al., 2011).

Diante do observado, o presente estudo reforçou o potencial da genisteína no tratamento da EM ao mostrar o atraso no aparecimento e redução na pontuação dos sinais clínicos na EAE, além da capacidade desse fitoestrógeno de modular TLRs e aumentar a produção de IFN- β endógeno.

7 Conclusão

O tratamento com genisteína, antes do aparecimento dos sinais clínicos da EAE, foi capaz de demonstrar o potencial neuroprotetor desse fitoestrógeno, por promover o atraso no aparecimento dos sinais clínicos e a redução na gravidade da doença, reforçando o potencial terapêutico da genisteína no tratamento da EM.

Os resultados sugerem que a genisteína é capaz de modular os TLRs, promovendo o aumento da liberação de IFN- β endógeno, reduzindo a diferenciação de células produtoras de citocinas próinflamatórias e favorecendo o desenvolvimento de um ambiente regulador.

Portanto, o uso da genisteína através da suplementação e da dieta rica em soja, poderia se aliar a já estabelecidas terapias para a EM com IFN- β , melhorando o quadro clínico da doença e prevenindo novos surtos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL-MAJID, K.B.; WEFER, J.; STADELMANN, C.; STEFFERL, A.; LASSMANN, H.; OLSSON, T.; HARRIS, R.A. 2003. Comparing the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis in CD4^{-/-} and CD8^{-/-} DBA/1 mice defines qualitative roles of different T cell subsets. **Journal of Neuroimmunology**, **141 (1-2)**: 10-9.

ACAZ-FONSECA, E.; SANCHEZ-GONZALEZ, R.; AZCOITIA, I.; AREVALO, M.A.; GARCIA-SEGURA, L.M. 2014. Role of astrocytes in the neuroprotective actions of 17β-estradiol and selective estrogen receptor modulators. **Molecular and Cellular Endocrinology**, **389 (1-2)**: 48-57.

AHARONI, R.; SASSON, E.; BLUMENFELD-KATZIR, T.; EILAM, R.; SELA, M.; ASSAF, Y.; ARNON, R. 2013. Magnetic resonance imaging characterization of different experimental autoimmune encephalomyelitis models and the therapeutic effect of glatiramer acetate. **Experimental Neurology**, **240**: 130-144.

AHMED, S.A. 2000. The immune system as a potential target for environmental estrogens (endocrine disrupters): a new emerging field. **Toxicology**, **150 (1-3)**: 191-206.

AKIRA, S.; SATO, S. 2003. Toll-like receptors and their signaling mechanisms. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, **35 (9)**: 555–562.

ALLEN, J. 2016. Microbiota, Parasites and Immunity. **Parasite Immunology**, **38 (1)**: 3-4.

ÁLVAREZ-SÁNCHEZ, N.; CRUZ-CHAMORRO, I.; LÓPEZ-GONZÁLEZ, A.; UTRILLA, J.C.; FERNÁNDEZ-SANTOS, J.M.; MARTÍNEZ-LÓPEZ, A.; LARDONE, P.J.; GUERRERO, J.M.; CARRILLO-VICO, A. 2015. Melatonin controls experimental autoimmune encephalomyelitis by altering the T effector/regulatory balance. **Brain, Behavior, and Immunity**, **50**: 101-114.

ANDERSSON, A.; COVACU, R.; SUNNEMARK, D.; DANILOV, A.I.; DAL BIANCO, A.; KHADEMI, M.; WALLSTRÖM, E.; LOBELL, A.; BRUNDIN, L.; LASSMANN, H.; HARRIS, R.A. 2008. Pivotal advance: HMGB1 expression in active lesions of human and experimental multiple sclerosis. **Journal of Leukocyte Biology**, **84 (5)**: 1248-1255.

APOSTOLOU, I.; VERGINIS, P.; KRETSCHMER, K.; POLANSKY, J.; HÜHN, J.; VON BOEHMER, H. 2008. Peripherally induced Treg: mode, stability, and role in specific tolerance. **Journal of Clinical Immunology**, **28 (6)**: 619-624.

AREVALO, M.A.; AZCOITIA, I.; GARCIA-SEGURA, L.M. 2015. The neuroprotective actions of oestradiol and oestrogen receptors. **Nature Reviews**, **16 (1)**: 17-29.

AXTELL, R.C.; STEINMAN, L. 2009. Gaining entry to an uninflamed brain. **Nature Immunology**, **10 (5)**: 453-455.

AZCOITIA, I.; MORENO, A.; CARRERO, P.; PALACIOS, S.; GARCIA-SEGURA, L.M. 2006. Neuroprotective effects of soy phytoestrogens in the rat brain. **Gynecological Endocrinology**, **22 (2)**: 63-69.

BABBE, H.; ROERS, A.; WAISMAN, A.; LASSMANN, H.; GOEBELS, N.; HOHLFELD, R.; FRIESE, M.; SCHRÖDER, R.; DECKERT, M.; SCHMIDT, S.; RAVID, R.; RAJEWSKY, K. 2000. Clonal expansion of CD8+ T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. **The Journal of Experimental Medicine**, **192 (3)**: 393-404.

BAKER, D.; AMOR, S. 2014. Experimental autoimmune encephalomyelitis is a good model of multiple sclerosis if used wisely. **Multiple Sclerosis and Related Disorders**, **3 (5)**: 555-564.

BANAIEE, N.; KINCAID, E.Z.; BUCHWALD, U.; JACOBS, W.R.JR.; ERNST, J.D. 2006. Potent inhibition of macrophage responses to IFN-gamma by live virulent Mycobacterium tuberculosis is independent of mature mycobacterial lipoproteins but dependent on TLR2. **The Journal of Immunology**, **176 (5)**: 3019-3027.

BANG, O.Y.; HONG, H.S.; KIM, D.H.; KIM, H.; BOO, J.H.; HUH, K.; MOOK-JUNG, I. 2004. Neuroprotective effect of genistein against beta amyloid-induced neurotoxicity. **Neurobiology of Disease**, **16 (1)**: 21-28.

BATOULIS, H.; RECKS, M.S.; ADDICKS, K.; KUERTEN, S. 2011. Experimental autoimmune encephalomyelitis--achievements and prospective advances. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, **119 (12)**: 819-830.

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

BECK, V.; ROHR, U.; JUNGBAUER, A. 2005. Phytoestrogens derived from red clover: an alternative to estrogen replacement therapy? **Journal of Steroid Biochemistry**, **94 (5)**: 499-518.

BELKAID, Y.; HAND, T.W. 2014. Role of the microbiota in immunity and inflammation. **Cell**, **157 (1)**: 121-141.

BEN-NUN, A.; KAUSHANSKY, N.; KAWAKAMI, N.; KRISHNAMOORTHY, G.; BERER, K.; LIBLAU, R.; HOHLFELD, R.; WEKERLE, H. 2014. From classic to spontaneous and humanized models of multiple sclerosis: impact on understanding pathogenesis and drug development. **Journal of Autoimmunity**, **54**: 33-50.

BERER, K.; MUES, M.; KOUTROLOS, M.; RASBI, Z.A.; BOZIKI, M.; JOHNER, C.; WEKERLE, H.; KRISHNAMOORTHY, G. 2011. Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. **Nature**, **479 (7374)**: 538-541.

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

BETTELLI, E.; SULLIVAN, B.; SZABO, S.J.; SOBEL, R.A.; GLIMCHER, L.H.; KUCHROO, V.K. 2004. Loss of T-bet, but not STAT1, prevents the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. **The Journal of Experimental Medicine**, **200 (1)**: 79-87.

BIEBACK, K.; LIEN, E.; KLAGGE, I.M.; AVOTA, E.; SCHNEIDER-SCHAULIES, J.; DUPREX, W.P.; WAGNER, H.; KIRSCHNING, C.J.; TER MEULEN, V.; SCHNEIDER-SCHAULIES, S. 2002. Hemagglutinin protein of wild-type measles virus activates Toll-like receptor 2 signaling. **Journal of Virology**, **76 (17)**: 8729-8736.

BITTNER, S.; AFZALI, A.M.; WIENDL, H.; MEUTH, S.G. 2014. Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG35-55) induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 mice. **Journal of Visualized Experiments**, **(86)** 1-5.

BODHANKAR, S.; WANG, C.; VANDENBARK, A.A.; OFFNER, H. 2011. Estrogen-induced protection against experimental autoimmune encephalomyelitis is abrogated in the absence of B cells. **European Journal of Immunology**, **41(4)**: 1165-1175.

- BOUMAN, A.; HEINEMAN, M.J.; FAAS, M.M. 2005. Sex hormones and the immune response in humans. **Human Reproduction Update**, **11 (4)**: 411-423.
- BRANN, D.W.; DHANDAPANI, K.; WAKADE, C.; MAHESH, V.B.; KHAN, M.M. 2007. Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogen: basic mechanisms and clinical implications. **Steroids**, **72 (5)**: 381-405.
- BSIBSI, M.; RAVID, R.; GVERIC, D.; VAN NOORT, J.M. 2002. Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, **61 (11)**: 1013-1021.
- BUSTAMANTE, M.F.; MORCILLO-SUÁREZ, C.; MALHOTRA, S.; RIO, J.; LEYVA, L.; FERNÁNDEZ, O.; ZETTL, U.K.; KILLESTEIN, J.; BRASSAT, D.; GARCÍA-MERINO, J.A.; SÁNCHEZ, A.J.; URCELAY, E.; ALVAREZ-LAFUENTE, R.; VILLAR, L.M.; ALVAREZ-CERMEÑO, J.C.; FARRÉ, X.; LECHNER-SCOTT, J.; VANDENBROECK, K.; RODRÍGUEZ-ANTIGÜEDAD, A.; DRULOVIC, J.S.; MARTINELLI BONESCHI, F.; CHAN, A.; OKSENBERG, J.; NAVARRO, A.; MONTALBAN, X.; COMABELLA, M. 2015. Pharmacogenomic study in patients with multiple sclerosis: Responders and nonresponders to IFN- β . **Neurology, Neuroimmunology & Neuroinflammation**, **2 (5)**: e154.
- CALABRESI, P.A. 2002. Considerations in the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis. **Neurology**, **58 (8 Suppl 4)**: S10-22.
- CASTRO, S.B.; JUNIOR, C.O.; ALVES, C.C.; DIAS, A.T.; ALVES, L.L.; MAZZOCOLI, L.; MESQUITA, F.P.; FIGUEIREDO, N.S.; JULIANO, M.A.; CASTAÑÓN, M.C.; GAMEIRO, J.; ALMEIDA, M.V.; TEIXEIRA, H.C.; FERREIRA, A.P. 2012. Immunomodulatory effects and improved prognosis of experimental autoimmune encephalomyelitis after O-tetradecanoyl-genistein treatment. **International Immunopharmacology**, **12 (2)**: 465-470.
- CHAKRABARTI, M.; HAQUE, A.; BANIK, N.L.; NAGARKATTI, P.; NAGARKATTI, M.; RAY, S.K. 2014. Estrogen receptor agonists for attenuation of neuroinflammation and neurodegeneration. **Brain Research Bulletin**, **109**: 22-31.
- CHEN, M.; CHEN, G.; DENG, S.; LIU, X.; HUTTON, G.J.; HONG, J. 2012. IFN- β induces the proliferation of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells through upregulation of GITRL on dendritic cells in the treatment of multiple sclerosis. **Journal of Neuroimmunology**, **242 (1-2)**: 39-46.

CHEN, G.; SHANNON, M. 2013. Transcription factors and th17 cell development in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Critical Reviews in Immunology**, **33 (2)**: 165-182.

CHEN, X.; WINKLER-PICKETT, R.T.; CARBONETTI, N.H.; ORTALDO, JR.; OPPENHEIM, J.J.; HOWARD, O.M. 2006. Pertussis toxin as an adjuvant suppresses the number and function of CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. **European Journal of Immunology**, **36 (3)**: 671-680.

CHENG, W.; ZHAO, Q.; XI, Y.; LI, C.; XU, Y.; WANG, L.; NIU, X.; WANG, Z.; CHEN, G. 2015. IFN- β inhibits T cells accumulation in the central nervous system by reducing the expression and activity of chemokines in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Molecular Immunology**, **64 (1)**: 152-162.

CHERVONSKY, A.V. 2010. Influence of microbial environment on autoimmunity. **Nature Immunology**, **11 (1)**: 28-35.

CHRISTEN, U.; VON HERRATH, M.G. 2004. Induction, acceleration or prevention of autoimmunity by molecular mimicry. **Molecular Immunology**, **40 (14-15)**: 1113-1120.

CHRISTEN, U.; VON HERRATH, M.G. 2005. Infections and autoimmunity - good or bad? **The Journal of Immunology**, **174 (12)**: 7481-7486.

CHRISTIANSON, M.S.; MENSAH, V.A.; SHEN, W. 2015. Multiple sclerosis at menopause: Potential neuroprotective effects of estrogen. **Maturitas**, **80 (2)**: 133-139.

COMI, G.; MARTINELLI, V.; RODEGHER, M.; MOIOLA, L.; LEOCANI, L.; BAJENARU, O.; CARRA, A.; ELOVAARA, I.; FAZEKAS, F.; HARTUNG, H.P.; HILLERT, J.; KING, J.; KOMOLY, S.; LUBETZKI, C.; MONTALBAN, X.; MYHR, K.M.; PREZIOSA, P.; RAVNBORG, M.; RIECKMANN, P.; ROCCA, M.A.; WYNN, D.; YOUNG, C.; FILIPPI, M. 2013. Effects of early treatment with glatiramer acetate in patients with clinically isolated syndrome. **Multiple Sclerosis: Clinical and Laboratory Research**, **19 (8)**: 1074-1083.

COMPSTON, A.; COLES, A. 2008. Multiple sclerosis. **Lancet**, **9648**: 1502-1517.

COMPTON, T.; KURT-JONES, E.A.; BOEHME, K.W.; BELKO, J.; LATZ, E.; GOLENBOCK, D.T.; FINBERG, R.W. 2003. Human cytomegalovirus activates

inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. **Journal of Virology**, **77 (8)**: 4588-4596.

CONFAVREUX, C.; VUKUSIC, S. 2006. Age at disability milestones in multiple sclerosis. **Brain**, **129 (Pt 3)**: 595-605.

CONFAVREUX, C.; VUKUSIC, S.; MOREAU, T.; ADELEINE, P. 2000. Relapses and progression of disability in multiple sclerosis. **The New England Journal of Medicine**, **343 (20)**: 1430-1438.

CONSTANTINESCU, C.S.; FAROOQI, N.; O'BRIEN, K.; GRAN, B. 2011. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). **British Journal of Pharmacology**, **164 (4)**: 1079-1106.

COOKE, P.S.; SELVARAJ, V.; YELLAYI, S. 2006. Genistein, estrogen receptors, and the acquired immune response. **The Journal of Nutrition**, **136 (3)**: 704-708.

CORREALE, J.; FAREZ, M. 2007. Association between parasite infection and immune responses in multiple sclerosis. **Annals of Neurology**, **61 (2)**: 97-108.

CORREALE, J.; FAREZ, M.F. 2011. The impact of parasite infections on the course of multiple sclerosis. **Journal of Neuroimmunology**, **233 (1-2)**: 6-11.

CORREALE, J.; FAREZ, M.; RAZZITTE, G. 2008. Helminth infections associated with multiple sclerosis induce regulatory B cells. **Annals of Neurology**, **64 (2)**: 187-199.

CORREALE, J.; VILLA, A. 2010. Role of CD8+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells in multiple sclerosis. **Annals of Neurology**, **67 (5)**: 625-638.

COTTALORDA, A.; MERCIER, B.C.; MBITIKON-KOBO, F.M.; ARPIN, C.; TEOH, D.Y.; MCMICHAEL, A.; MARVEL, J.; BONNEFOY-BÉRARD, N. 2009. TLR2 engagement on memory CD8(+) T cells improves their cytokine-mediated proliferation and IFN-gamma secretion in the absence of Ag. **European journal of Immunology**, **39 (10)**: 2673-2681.

CRAWFORD, M.P.; YAN, S.X.; ORTEGA, S.B.; MEHTA, R.S.; HEWITT, R.E.; PRICE, D.A.; STASTNY, P.; DOUEK, D.C.; KOUP, R.A.; RACKE, M.K.; KARANDIKAR, N.J. 2004. High prevalence of autoreactive, neuroantigen-specific

CD8+ T cells in multiple sclerosis revealed by novel flow cytometric assay. **Blood**, **103 (11)**: 4222-4231.

CROXFORD, A.L.; KURSCHUS, F.C.; WAISMAN, A. 2011. Mouse models for multiple sclerosis: historical facts and future implications. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1812 (2)**: 177-183.

CUROTTO DE LAFAILLE, M.A.; LAFAILLE, J.J. 2009. Natural and adaptive Foxp3⁺ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? **Immunity**, **30 (5)**: 626-635.

CUTOLO, M.; STRAUB, R.H. 2009. Insights into endocrine-immunological disturbances in autoimmunity and their impact on treatment. **Arthritis Research and Therapy**, **11 (2)**: 218.

DE NARDO, D. 2015. Toll-like receptors: Activation, signalling and transcriptional modulation. **Cytokine**, **74 (2)**: 181-189.

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

DHARMAPPA, K.K.; MOHAMED, R.; SHIVAPRASAD, H.V.; VISHWANATH, B.S. 2010. Genistein, a potent inhibitor of secretory phospholipase A2: a new insight in down regulation of inflammation. **Inflammopharmacology**, **18 (1)**: 25-31.

DHIB-JALBUT, S.; MARKS, S. 2010. Interferon-beta mechanisms of action in multiple sclerosis. **Neurology**, **74 (Suppl 1)**: S17-S24.

DIAS, A.T.; CASTRO, S.B.R.; SOUZA ALVES, C.C.; MESQUITA, F.P.; FIGUEIREDO, N.S.V.; EVANGELISTA, M.G.; CASTAÑON, M.C.M.N.; JULIANO, M.A.; FERREIRA, A.P. 2015. Different MOG35-55 concentrations induce distinguishable inflammation through early regulatory response by IL-10 and TGF- β in mice CNS despite unchanged clinical course. **Cellular Immunology**, **293 (2015)**: 87-94.

DING, B.; YUAN, L.; YU, H.; LI, L.; MA, W.; BI, Y.; FENG, J.; XIAO, R. 2011. Genistein and folic acid prevent oxidative injury induced by β -amyloid peptide. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, **108 (5)**: 333-340.

DOLGANIUC, A.; OAK, S.; KODYS, K.; GOLENBOCK, D.T.; FINBERG, R.W.; KURT-JONES, E.; SZABO, G. 2004. Hepatitis C core and nonstructural 3 proteins trigger toll-like receptor 2-mediated pathways and inflammatory activation. **Gastroenterology**, **127 (5)**: 1513-1524.

DORNER, M.; BRANDT, S.; TINGUELY, M.; ZUCOL, F.; BOURQUIN, J.P.; ZAUNER, L.; BERGER, C.; BERNASCONI, M.; SPECK, R.F.; NADAL, D. 2009. Plasma cell tolllike receptor (TLR) expression differs from that of B cells, and plasma cell TLR triggering enhances immunoglobulin production. **Immunology**, **128 (4)**: 573-579.

DU, S.; SANDOVAL, F.; TRINH, P.; UMEDA, E.; VOSKUHL, R. 2011. Estrogen receptor- β ligand treatment modulates dendritic cells in the target organ during autoimmune demyelinating disease. **European Journal of Immunology**, **41 (1)**: 140-150.

DUMITRIU, D.; RAPP, P.R.; MCEWEN, B.S.; MORRISON, J.H. 2010. Estrogen and the aging brain: an elixir for the weary cortical network. **Annals of the New York Academy of Sciences**, **1204**: 104-112.

DUNN, S.E.; GUNDE, E.; LEE, H. 2015. Sex-Based Differences in Multiple Sclerosis (MS): Part II: Rising Incidence of Multiple Sclerosis in Women and the Vulnerability of Men to Progression of this Disease. **Current Topics in Behavioral Neurosciences**, **26**: 57-86.

ELISEEVA, D.D.; ZAVALISHIN, I.A.; KARAULOV, A.V.; BYKOVSKAIA, S.N. 2012. The role of regulatory T cells in the development of autoimmune process in multiple sclerosis. **Vestnik Rossiĭskoĭ Akademii Meditsinskikh Nauk**, (3): 68-74.

ELLOSO, M.M.; PHIEL, K.; HENDERSON, R.A.; HARRIS, H.A.; ADELMAN, S.J. 2005. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis using estrogen receptor-selective ligands. **The Journal of Endocrinology**, **185 (2)**: 243-252.

ELTAYEB, S.; BERG, A.L.; LASSMANN, H.; WALLSTRÖM, E.; NILSSON, M.; OLSSON, T.; ERICSSON-DAHLSTRAND, A.; SUNNEMARK, D. 2007. Temporal expression and cellular origin of CC chemokine receptors CCR1, CCR2 and CCR5 in the central nervous system: insight into mechanisms of MOG-induced EAE. **Journal of Neuroinflammation**, **4**: 14.

ENGELHARDT, B.; RANSOHOFF, R.M. 2012. Capture, crawl, cross: the T cell code to breach the blood-brain barriers. **Trends in Immunology**, **33 (12)**: 579-589.

ETEMADIFAR, M.; AFZALI, P.; ABTAHI, S.H.; RAMAGOPALAN, S.V.; NOURIAN, S.M.; MURRAY, R.T.; FEREDAN-ESFAHANI, M. 2014. Safety and efficacy of mitoxantrone in pediatric patients with aggressive multiple sclerosis. **European Journal of Paediatric Neurology**, **18 (2)**: 119-125.

FARINA, C.; KRUMBHOLZ, M.; GIESE, T.; HARTMANN, G.; ALOISI, F.; MEINL, E. 2005. Preferential expression and function of Toll-like receptor 3 in human astrocytes. **Journal of Neuroimmunology**, **159 (1-2)**: 12-19.

FLETCHER, J.M.; LALOR, S.J.; SWEENEY, C.M.; TUBRIDY, N.; MILLS, K.H. 2010. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol*. **Clinical and Experimental Immunology**, **162 (1)**: 1-11.

FLUGEL, A.; BERKOWICZ, T.; RITTER, T.; LABEUR, M.; JENNE, D.E.; LI, Z.; ELLWART, J.W.; WILLEM, M.; LASSMANN, H.; WEKERLE, H. 2001. Migratory activity and functional changes of green fluorescent effector cells before and during experimental autoimmune encephalomyelitis. **Immunity**, **14 (5)**: 547-560.

FORD, M.L.; EVAVOLD, B D. 2005. Specificity, magnitude, and kinetics of MOG-specific CD8+ T cell responses during experimental autoimmune encephalomyelitis. **European Journal of Immunology**, **35 (1)**: 76-85.

FROHMAN, E.M.; RACKE, M.K.; RAINE, C.S. 2006. Multiple sclerosis – the plaque and its pathogenesis. **The New England journal of Medicine**, **354 (9)**: 942-955.

FUJIMOTO, C.; YU, C.R.; SHI, G.; VISTICA, B.P.; WAWROUSEK, E.F; KLINMAN, D.M; CHAN, C.C; EGWUAGU, C.E; GERY, I. 2006. Pertussis Toxin Is Superior to TLR Ligands in Enhancing Pathogenic Autoimmunity, Targeted at a Neo-Self Antigen, by Triggering Robust Expansion of Th1 Cells and Their Cytokine Production. **The Journal of Immunology**, **177**: 6896-6903.

FURLAN, R.; ROVARIS, M.; MARTINELLI BONESCHI, F.; KHADEMI, M.; BERGAMI, A.; GIRONI, M.; DELEIDI, M.; AGOSTA, F.; FRANCIOTTA, D.; SCARPINI, E.; UCCELLI, A.; ZAFFARONI, M.; KURNE, A.; COMI, G.; OLSSON, T.; FILIPPI, M.; MARTINO, G. 2005. Immunological patterns identifying disease course and evolution in multiple sclerosis patients. **Journal of Neuroimmunology**, **165 (1-2)**: 192-200.

GABY, A. 2013. Multiple sclerosis. **Global Advances in Health and Medicine**, **2 (1)**: 50-56.

- GALDIERO, M.; GALDIERO, M.; FINAMORE, E.; ROSSANO, F.; GAMBUTTA, M.; CATANIA, M.R.; TETI, G.; MIDIRI, A.; MANCUSO, G. 2004. Haemophilus influenzae porin induces toll-like receptor 2-mediated cytokine production in human monocytes and mouse macrophages. **Infection and Immunity**, **72 (2)**: 1204-1209.
- GALEA, I.; BERNARDES-SILVA, M.; FORSE, P.A.; VAN ROOIJEN, N.; LIBLAU, R.S.; PERRY, V.H. 2007. An antigen-specific pathway for CD8 T cells across the blood-brain barrier. **The Journal of Experimental Medicine** , **204 (9)**: 2023-2030.
- GANAI, A.A.; FAROOQI, H. 2015. Bioactivity of genistein: A review of in vitro and in vivo studies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, **76**: 30-38.
- GANDHI, R.; LARONI, A.; WEINER, H.L. 2010. Role of the innate immune system in the pathogenesis of multiple sclerosis. **Journal of Neuroimmunology**, **221 (1-2)**: 7-14.
- GARCÍA MERINO, A.; RAMÓN ARA CALLIZO, J.; FERNÁNDEZ FERNÁNDEZ, O.; LANDETE PASCUAL, L.; MORAL TORRES, E.; RODRÍGUEZ-ANTIGÜEDAD ZARRANTZ, A. 2016. **Consensus statement on the treatment of multiple sclerosis by the Spanish Society of Neurology in 2016**. **Neurologia**: 2016.
- GARIDOU, L.; LAFFONT, S.; DOUIN-ECHINARD, V.; COUREAU, C.; KRUST, A.; CHAMBON, P.; GUÉRY, J.C. 2004. Estrogen receptor alpha signaling in inflammatory leukocytes is dispensable for 17beta-estradiol-mediated inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis. **The Journal of Immunology**, **173 (4)**: 2435-2442.
- GLANZ, B.I.; MUSALLAM, A.; RINTELL, D.J.; CHITNIS, T.; WEINER, H.L.; HEALY, B.C. 2014. Treatment satisfaction in multiple sclerosis. **International Journal of MS Care**, **16 (2)**: 68-75.
- GOCKE, A.R.; CRAVENS, P.D.; BEN, L.H.; HUSSAIN, R.Z.; NORTHROP, S.C.; RACKE, M.K.; LOVETT-RACKE, A.E. 2007. T-bet regulates the fate of Th1 and Th17 lymphocytes in autoimmunity. *J Immunol*. **The Journal of Immunology**, **178 (3)**: 1341-1348.
- GOLD, R.; LININGTON, C.; LASSMANN, H. 2006. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. **Brain**, **129 (Pt 8)**: 1953-1971.

GOLD, S.M.; SASIDHAR, M.V.; MORALES, L.B.; DU, S.; SICOTTE, N.L.; TIWARI-WOODRUFF, S.K.; VOSKUHL, R.R. 2009. Estrogen treatment decreases matrix metalloproteinase (MMP)-9 in autoimmune demyelinating disease through estrogen receptor alpha (ERalpha). **Laboratory Investigation**, **89 (10)**: 1076-1083.

GOLDSTEIN, J.D.; PÉROL, L.; ZARAGOZA, B.; BAEYENS, A.; MARODON, G.; PIAGGIO, E. 2013. Role of cytokines in thymus- versus peripherally derived-regulatory T cell differentiation and function. **Frontiers in Immunology**, **4**: 155.

GOODIN, D.S.; BATES, D. 2009. Treatment of early multiple sclerosis: the value of treatment initiation after a first clinical episode. **Multiple Sclerosis**, **5 (10)**: 1175-1182.

GOOSHE, M.; ABDOLGHAFFARI, A.H.; GAMBUZZA, M.E.; REZAEI, N. 2014. The role of Toll-like receptors in multiple sclerosis and possible targeting for therapeutic purposes. **Reviews in the Neurosciences**, **25 (5)**: 713-739.

GOURRAUD, P.A.; HARBO, H.F.; HAUSER, S.L.; BARANZINI, S.E. 2012. The genetics of multiple sclerosis: an up-to-date review. **Immunological Reviews**, **248 (1)**: 87-103.

GOVERMAN, J. 2009. Autoimmune T cell response in the central nervous system. **Nature Reviews Immunology**, **9 (6)**: 393-407.

GUO, B.; CHANG, E.Y.; CHENG, G. 2008. The type I IFN induction pathway constrains Th17-mediated autoimmune inflammation in mice. **The Journal of Clinical Investigation**, **118 (5)**: 1680-1690.

GUO, T.L.; MCCAY, J.A.; ZHANG, L.X.; BROWN, R.D.; YOU, L.; KARROW, N.A.; GERMOLEC, D.R.; WHITE, K.L.Jr. 2001. Genistein modulates immune responses and increases host resistance to B16F10 tumor in adult female B6C3F1 mice. **The Journal of Nutrition**, **131 (12)**: 3251–3258.

HAN, Y.; BO, Z.J.; XU, M.Y.; SUN, N.; LIU, D.H. 2014. The Protective Role of TLR3 and TLR9 Ligands in Human Pharyngeal Epithelial Cells Infected with Influenza A Virus. **The Korean Journal of Physiology & Pharmacology**, **18 (3)**: 225-231.

HARTUNG, H.P.; AKTAS, O.; MENGE, T.; KIESEIER, B.C. 2014. Immune regulation of multiple sclerosis. **Handbook of Clinical Neurology**, **122**: 3-14.

HEDSTRÖM, A.K.; OLSSON, T.; ALFREDSSON, L. 2015. Smoking is a major preventable risk factor for multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis: Clinical and Laboratory Research**, pii: 1352458515609794.

HEMMER, B.; KERSCHENSTEINER, M.; KORN, T. 2015. Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis. **The Lancet Neurology**, **14 (4)**: 406-419.

HENDERSON, A.P.; BARNETT, M.H.; PARRATT, J.D.; PRINEAS, J.W. 2009. Multiple sclerosis: Distribution of inflammatory cells in newly forming lesions. **Annals of Neurology**, **66 (6)**: 739-753.

HERNÁNDEZ-PEDRO, N.Y.; ESPINOSA-RAMIREZ, G.; de la CRUZ, V.P.; PINEDA, B.; SOTELO, J. 2013. Initial immunopathogenesis of multiple sclerosis: innate immune response. **Clinical & Developmental Immunology**, **2013**: 413465.

HEWAGAMA, A.; PATEL, D.; YARLAGADDA, S.; STRICKLAND, F.M.; RICHARDSON, B.C. 2009. Stronger inflammatory/cytotoxic T-cell response in women identified by microarray analysis. **Genes and Immunity**, **10 (5)**: 509-516.

HICKEY, W.F.; COHEN, J.A.; BURNS, J.B. 1987. A quantitative immunohistochemical comparison of actively versus adoptively induced experimental allergic encephalomyelitis in the Lewis rat. **Cellular Immunology**, **109 (2)**: 272-281.

HIROTA, K.; YOSHITOMI, H.; HASHIMOTO, M.; MAEDA, S.; TERADAIRA, S.; SUGIMOTO, N.; YAMAGUCHI, T.; NOMURA, T.; ITO, H.; NAKAMURA, T.; SAKAGUCHI, N.; SAKAGUCHI, S. 2007. Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model. **The Journal of Experimental Medicine**, **204 (12)**: 2803-2812.

HOFSTETTER, H.H.; SHIVE, C.L.; FORSTHUBER, T.G. 2002. Pertussis toxin modulates the immune response to neuroantigens injected in incomplete Freund's adjuvant: induction of Th1 cells and experimental autoimmune encephalomyelitis in the presence of high frequencies of Th2 cells. **The Journal of Immunology**, **169 (1)**: 117-125.

HOHLFELD, R.; WEKERLE, H. 2004. Autoimmune concepts of multiple sclerosis as a basis for selective immunotherapy: from pipe dreams to (therapeutic) pipelines. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **101 Suppl 2**: 14599-14606.

HOLMAN, D.W.; KLEIN, R.S.; RANSOHOFF, R.M. 2011. The blood-brain barrier, chemokines and multiple sclerosis. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1812 (2)**: 220-230.

HONDA, K.; OHBA, Y.; YANAI, H.; NEGISHI, H.; MIZUTANI, T.; TAKAOKA, A.; TAYA, C.; TANIGUCHI, T. 2005. Spatiotemporal regulation of MyD88-IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction. **Nature**, **434 (7036)**: 1035-1040.

HSIAO, H.B.; CHOU, A.H.; LIN, S.I.; CHEN, I.H.; LIEN, S.P.; LIU, C.C.; CHONG, P.; LIU, S.J. 2014. Toll-like receptor 9-mediated protection of enterovirus 71 infection in mice is due to the release of danger-associated molecular patterns. **Journal of Virology**, **88 (20)**: 11658-11670.

IFERGAN, I.; KEBIR, H.; ALVAREZ, J.I.; MARCEAU, G.; BERNARD, M.; BOURBONNIÈRE, L.; POIRIER, J.; DUQUETTE, P.; TALBOT, P.J.; ARBOUR, N.; PRAT, A. 2011. Central nervous system recruitment of effector memory CD8+ T lymphocytes during neuroinflammation is dependent on $\alpha 4$ integrin. **Brain**, **134 (Pt 12)**: 3560-3577.

IMANISHI, T.; HARA, H.; SUZUKI, S.; SUZUKI, N.; AKIRA, S.; SAITO, T. 2007. Cutting edge: TLR2 directly triggers Th1 effector functions. **The Journal of Immunology**, **178 (11)**: 6715-6719.

INTERNATIONAL MULTIPLE SCLEROSIS GENETICS CONSORTIUM et al., 2011. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. **Nature**, **476 (7359)**: 214-219.

ISHII, K.J.; KOYAMA, S.; NAKAGAWA, A.; COBAN, C.; AKIRA, S. 2008. Host innate immune receptors and beyond: making sense of microbial infections. **Cell Host & Microbe**, **3 (6)**: 352-363.

IVANOV, I.I.; MCKENZIE, B.S.; ZHOU, L.; TADOKORO, C.E.; LEPELLEY, A.; LAFAILLE, J.J.; CUA, D.J.; LITTMAN, D.R. 2006. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. **Cell**, **126 (6)**: 1121-1133.

IWASAKI, M.; TSUGANE, S. 2011. Risk factors for breast cancer: epidemiological evidence from Japanese studies. **Cancer Science**, **102 (9)**: 1607-1614.

JACOB, A.; MCKEON, A.; NAKASHIMA, I.; SATO, D.K.; ELSONE, L.; FUJIHARA, K.; DE SEZE, J. 2013. Current concept of neuromyelitis optica (NMO) and NMO

spectrum disorders. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry, 84 (8):** 922-930.

JÄGER, A.; DARDALHON, V.; SOBEL, R.A.; BETTELLI, E.; KUCHROO, V.K. 2009. Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes. **The Journal of Immunology, 183 (11):** 7169-7177.

JAHROMI, S.R.; ARREFHOSSEINI, S.R.; GHAEMI, A.; ALIZADEH, A.; SABETGHADAM, F.; TOGHA, M. 2014. Effect of oral genistein administration in early and late phases of allergic encephalomyelitis. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences, 17 (7):** 509-515.

JAHROMI, S.R.; TOGHAE, M.; JAHROMI, M.J.; ALOOSH, M. 2012. Dietary pattern and risk of multiple sclerosis. **Iranian Journal of Neurology, 11 (2):** 47-53.

JI, G.; YANG, Q.; HAO, J.; GUO, L.; CHEN, X.; HU, J.; LENG, L.; JIANG, Z. 2011. Anti-inflammatory effect of genistein on non-alcoholic steatohepatitis rats induced by high fat diet and its potential mechanisms. **International Immunopharmacology, 11 (6):** 762-768.

JILEK, S.; SCHLUEP, M.; ROSSETTI, A.O.; GUIGNARD, L.; LE GOFF, G.; PANTALEO, G.; DU PASQUIER, R.A. 2007. CSF enrichment of highly differentiated CD8+ T cells in early multiple sclerosis. **Clinical Immunology, 123 (1):** 105-113.

JOHANN, S.; BEYER, C. 2013. Neuroprotection by gonadal steroid hormones in acute brain damage requires cooperation with astroglia and microglia. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 137:** 71-81.

JOSEFOWICZ, S.Z.; LU, L.F.; RUDENSKY, A.Y. 2012. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. **Annual Review of Immunology, 30:** 531-564.

KARNI, A.; KOLDZIC, D.N.; BHARANIDHARAN, P.; KHOURY, S.J.; WEINER, H.L. 2002. IL-18 is linked to raised IFN-gamma in multiple sclerosis and is induced by activated CD4(+) T cells via CD40-CD40 ligand interactions. **Journal of Neuroimmunology, 125 (1-2):** 134-140.

KATSARAVA, Z.; EHLKEN, B.; LIMMROTH, V.; TAIPALE, K.; PATEL, S.N.; NIEMCZYK, G.; REHBERG-WEBER, K.; WERNSDÖRFER, C.; C.A.R.E. STUDY GROUP. 2015. Adherence and cost in multiple sclerosis patients treated with IM IFN

beta-1a: impact of the CARE patient management program. **BioMed Central Neurology**, **15**: 170.

KAWAI, T.; AKIRA, S. 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nature Immunology**, **11 (5)**: 373-384.

KAWAI, T.; SATO, S.; ISHII, K.J.; COBAN, C.; HEMMI, H.; YAMAMOTO, M.; TERAJ, K.; MATSUDA, M.; INOUE, J.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. 2004. Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. **Nature Immunology**, **5 (10)**: 1061-1068.

KAY, M.; HOJATI, Z.; DEGHANIAN, F. 2013. The molecular study of IFN β pleiotropic roles in MS treatment. **Iranian Journal of Neurology**, **12 (4)**: 149-156.

KEBIR, H.; KREYMBORG, K.; IFERGAN, I.; DODELET-DEVILLERS, A.; CAYROL, R.; BERNARD, M.; GIULIANI, F.; ARBOUR, N.; BECHER, B.; PRAT, A. 2007. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. **Nature Medicine**, **13 (10)**: 1173-1175.

KELCHTERMANS, H.; BILLIAU, A.; MATTHYS, P. 2008. How interferon-gamma keeps autoimmune diseases in check. **Trends in Immunology**, **29 (10)**: 479-486.

KENNEDY, K.J.; STRIETER, R.M.; KUNKEL, S.L.; LUKACS, N.W.; KARPUS, W.J. 1998. Acute and relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis are regulated by differential expression of the CC chemokines macrophage inflammatory protein-1alpha and monocyte chemoattractant protein-1. **Journal of Neuroimmunology**, **92 (1-2)**: 98-108.

KHOROOSHI, R.; MØRCH, M.T.; HOLM, T.H.; BERG, C.T.; DIEU, R.T.; DRÆBY, D.; ISSAZADEH-NAVIKAS, S.; WEISS, S.; LIENENKLAUS, S.; OWENS, T. 2015. Induction of endogenous Type I interferon within the central nervous system plays a protective role in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Acta Neuropathologica**, **130 (1)**: 107-118.

KIM, J.M.; UEHARA, Y.; CHOI, Y.J.; HA, Y.M.; YE, B.H.; YU, B.P.; CHUNG, H.Y. 2011. Mechanism of attenuation of pro-inflammatory Ang II-induced NF-kappaB activation by genistein in the kidneys of male rats during aging. **Biogerontology**, **12 (6)**: 537-550.

KIM, M.H.; KIM, H.M.; JEONG, H.J. 2016. Estrogen-like osteoprotective effects of glycine in in vitro and in vivo models of menopause. **Amino Acids**, **48 (3)**: 791-800.

KOCH-HENRIKSEN, N.; SØRENSEN, P.S. 2010. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. **The Lancet Neurology**, **9 (5)**: 520-532.

KOGISO, M.; SAKAI, T.; MITSUYA, K.; KOMATSU, T.; YAMAMOTO, S. 2006. Genistein suppresses antigen-specific immune responses through competition with 17 beta-estradiol for estrogen receptors in ovalbumin-immunized BALB/c mice. **Nutrition**, **22 (7-8)**: 802-809.

KOMAI-KOMA, M.; JONES, L.; OGG, G.S.; XU, D.; LIEW, F.Y. 2004. TLR2 is expressed on activated T cells as a costimulatory receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **101 (9)**: 3029-3034.

KOMIYAMA, Y.; NAKAE, S.; MATSUKI, T.; NAMBU, A.; ISHIGAME, H.; KAKUTA, S.; SUDO, K.; IWAKURA, Y. 2006. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. **The Journal of Immunology**, **177 (1)**: 566-573.

KOVATS, S. 2015. Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways. **Cellular Immunology**, **294 (2)**: 63-69.

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

KUIPER, G.G.; CARLSSON, B.; GRANDIEN, K.; ENMARK, E.; HÄGGBLAD, J.; NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J.A. 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. **Endocrinology**, **138 (3)**: 863-870.

KUIPER, G.G.; LEMMEN, J.G.; CARLSSON, B.; CORTON, J.C.; SAFE, S.H.; VAN DER SAAG, P.T.; VAN DER BURG, B.; GUSTAFSSON, J.A. 1998. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. **Endocrinology**, **139 (10)**: 4252-4263.

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

LA MANTIA, L.; DI PIETRANTONJ, C.; ROVARIS, M.; RIGON, G.; FRAU, S.; BERARDO, F.; GANDINI, A.; LONGOBARDI, A.; WEINSTOCK-GUTTMAN, B.;

VAONA, A. 2014. Interferons-beta versus glatiramer acetate for relapsing-remitting multiple sclerosis. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, **7**: CD009333

LAFON, M.; MEGRET, F.; LAFAGE, M.; PREHAUD, C. 2006. The innate immune facet of brain: human neurons express TLR-3 and sense viral dsRNA. **Molecular and Chemical Neuropathology**, **29 (3)**: 185-194

LAKSHMAN, M.; XU, L.; ANANTHANARAYANAN, V.; COOPER, J.; TAKIMOTO, C.H.; HELENOWSKI, I.; PELLING, J.C.; BERGAN, R.C. 2008. Dietary genistein inhibits metastasis of human prostate cancer in mice. **Cancer Research**, **68 (6)**: 2024-2032.

LASSMANN, H.; BRÜCK, W.; LUCCHINETTI, C.F. 2007. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. **Brain Pathology**, **17 (2)**: 210-218.

LAZAREVIC, V.; GLIMCHER, L.H. 2011. T-bet in disease. **Nature Immunology**, **12 (7)**: 597-606.

LEADBETTER, E.A.; BOURQUE, C.R.; DEVAUX, B.; OLSON, C.D.; SUNSHINE, G.H.; HIRANI, S.; WALLNER, B.P.; SMILEK, D.E.; HAPP, M.P. 1998. Experimental autoimmune encephalomyelitis induced with a combination of myelin basic protein and myelin oligodendrocyte glycoprotein is ameliorated by administration of a single myelin basic protein peptide. **The Journal of Immunology**, **161 (1)**: 504-512.

LEE, Y.K.; MENEZES, J.S.; UMESAKI, Y.; MAZMANIAN, S.K. 2011. Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **108 Suppl 1**: 4615-4622.

LEHMANN, P.V.; ROTTLAENDER, A.; KUERTEN, S. 2015. The autoimmune pathogenesis of multiple sclerosis. **Pharmazie**, **70 (1)**: 5-11.

LÉLU, K.; DELPY, L.; ROBERT, V.; FOULON, E.; LAFFONT, S.; PELLETIER, L.; ENGELHARDT, B.; GUÉRY, J.C. 2010. Endogenous estrogens, through estrogen receptor α , constrain autoimmune inflammation in female mice by limiting CD4⁺ T-cell homing into the CNS. **European Journal of Immunology**, **40 (12)**: 3489-3498.

LÉLU, K.; LAFFONT, S.; DELPY, L.; PAULET, P.E.; PÉRINAT, T.; TSCHANZ, S.A.; PELLETIER, L.; ENGELHARDT, B.; GUÉRY, J.C. 2011. Estrogen receptor α signaling in T lymphocytes is required for estradiol-mediated inhibition of Th1 and

Th17 cell differentiation and protection against experimental autoimmune encephalomyelitis. **The Journal of Immunology**, **187 (5)**: 2386-2393.

LERAY, E.; YAOUANQ, J.; LE PAGE, E.; COUSTANS, M.; LAPLAUD, D.; OGER, J.; EDAN, G. 2010. Evidence for a two-stage disability progression in multiple sclerosis. **Brain**, **133 (Pt 7)**: 1900-1913.

LERAY, E.; MOREAU, T.; FROMONT, A.; EDAN, G. 2016. Epidemiology of multiple sclerosis. **Revue Neurologique**, **172 (1)**: 3-13.

LEWIS, D.K.; JOHNSON, A.B.; STOHLGREN, S.; HARMS, A.; SOHRABJI, F. 2008. Effects of estrogen receptor agonists on regulation of the inflammatory response in astrocytes from young adult and middle-aged female rats. **Journal of Neuroimmunology**, **195 (1-2)**: 47-59.

LI, C.H.; LIN, M.H.; CHU, S.H.; TU, P.H.; FANG, C.C.; YEN, C.H.; LIANG, P.I.; HUANG, J.C.; SU, Y.C.; SYTWU, H.K.; CHEN, Y.M. 2015. Role of glycine N-methyltransferase in the regulation of T-cell responses in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Molecular Medicine**, **20**: 684-696.

LI, M.; ZHOU, Y.; FENG, G.; SU, S.B. 2009. The critical role of Toll-like receptor signaling pathways in the induction and progression of autoimmune diseases. **Current Molecular Medicine**, **9 (3)**: 365-374.

LIBBEY, J.E.; FUJINAMI, R.S. 2011. Experimental autoimmune encephalomyelitis as a testing paradigm for adjuvants and vaccines. **Vaccine**, **29 (17)**: 3356-362.

LIGGINS, J.; BLUCK, L.J.; RUNSWICK, S.; ATKINSON, C.; COWARD, W.A.; BINGHAM, S.A. 2000. Daidzein and genistein content of fruits and nuts. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, **11 (6)**: 326-331.

LIGGINS, J.; MULLIGAN, A.; RUNSWICK, S.; BINGHAM, S.A. 2002. Daidzein and genistein content of cereals. **European Journal of Clinical Nutrition**, **56 (10)**: 961-966.

LINDSEY, J.W. 2005. EAE: history, clinical signs, and disease course. In: LAVI, E.; CONSTANTINESCU, C.S. (eds) **Experimental Models of Multiple Sclerosis**. Springer, New York, p. 1–9.

LINKER, R.A.; WELLER, C.; LÜHDER, F.; MOHR, A.; SCHMIDT, J.; KNAUTH, M.; METSELAAR, J.M.; GOLD, R. 2008. Liposomal glucocorticosteroids in treatment of chronic autoimmune demyelination: long-term protective effects and enhanced efficacy of methylprednisolone formulations. **Experimental Neurology**, **211 (2)**: 397-406.

LIU, Y.J. 2005. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. **Annual Review of Immunology**, **23**: 275–306.

LONGHINI, A.L.; SANTOS, M.P.; PRADELLA, F.; MORAES, A.S.; DIONETE, A.C.; ANDRADE, M.D.; RUSSINI, P.G.; OLIVEIRA, E.C.; DE PAULA, R.O.; MORAIS, G.A.; FONSECA, E.S.; FARIAS, A.S.; SANTOS, L.M. 2014. In vivo administration of TLR9 agonist reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. The role of plasmacytoid dendritic cells and B lymphocytes. **CNS Neuroscience and Therapeutics**, **20 (8)**: 787-790.

LOPES PINHEIRO, M.A.; KOOIJ, G.; MIZEE, M.R.; KAMERMANS, A.; ENZMANN, G.; LYCK, R.; SCHWANINGER, M.; ENGELHARDT, B.; DE VRIES, H.E. 2016. Immune cell trafficking across the barriers of the central nervous system in multiple sclerosis and stroke. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1862 (3)**: 461-471.

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

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

LUO, L.J.; LIU, F.; LIN, Z.K.; XIE, Y.F.; XU, J.L.; TONG, Q.C.; SHU, R. 2012. Genistein regulates the IL-1 beta induced activation of MAPKs in human periodontal ligament cells through G protein-coupled receptor 30. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, **522 (1)**: 9–16.

MACKENZIE-GRAHAM, A.J.; RINEK, G.A.; AVEDISIAN, A.; MORALES, L.B.; UMEDA, E.; BOULAT, B.; JACOBS, R.E.; TOGA, A.W.; VOSKUHL, R.R. 2012. Estrogen treatment prevents gray matter atrophy in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Neuroscience Research**, **90 (7)**: 1310-1323.

MAGGIOLI, E.; MCARTHUR, S.; MAURO, C.; KIESWICH, J.; KUSTERS, D.H.; REUTELINGSPERGER, C.P.; YAQOUB, M.; SOLITO, E. 2016. Estrogen protects

the blood-brain barrier from inflammation-induced disruption and increased lymphocyte trafficking. **Brain, Behavior, and Immunity**, **51**: 212-222.

MALMESTRÖM, C.; LYCKE, J.; HAGHIGHI, S.; ANDERSEN, O.; CARLSSON, L.; WADENVIK, H.; OLSSON, B. 2008. Relapses in multiple sclerosis are associated with increased CD8+ T-cell mediated cytotoxicity in CSF. **Journal of Neuroimmunology**, **196 (1-2)**: 159-165.

MANDIA, D.; FERRARO, O.E.; NOSARI, G.; MONTOMOLI, C.; ZARDINI, E.; BERGAMASCHI, R. 2014. Environmental factors and multiple sclerosis severity: a descriptive study. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, **11 (6)**: 6417-6432.

MANGAN, P.R.; HARRINGTON, L.E.; O'QUINN, D.B.; HELMS, W.S.; BULLARD, D.C.; ELSON, C.O.; HATTON, R.D.; WAHL, S.M.; SCHOEB, T.R.; WEAVER, C.T. 2006. Transforming growth factor- β induces development of the Th17 lineage. **Nature**, **441 (7090)**: 231-234.

MARIK, C.; FELTS, P.A.; BAUER, J.; LASSMANN, H.; SMITH, K.J. 2007. Lesion genesis in a subset of patients with multiple sclerosis: a role for innate immunity? **Brain**, **130 (Pt 11)**: 2800-2815.

MARKLE, J.G.; FISH, E.N. 2014. Sex matters in immunity. **Trends in Immunology**, **35 (3)**: 97-104.

MARKOWITZ, C.E. 2007. Interferon-beta: mechanism of action and dosing issues. **Neurology**, **68 (24 Suppl 4)**: S8-11.

MAROTTA, F.; MAO, G.S.; LIU, T.; CHUI, D.H.; LORENZETTI, A.; XIAO, Y.; MARANDOLA, P. 2006. Anti-inflammatory and neuroprotective effect of a phytoestrogen compound on rat microglia. **Annals of the New York Academy of Sciences**, **1089**: 276-281.

MARTA, M.; ANDERSSON, A.; ISAKSSON, M.; KÄMPE, O.; LOBELL, A. 2008. Unexpected regulatory roles of TLR4 and TLR9 in experimental autoimmune encephalomyelitis. **European Journal of Immunology**, **38 (2)**: 565-575.

MARTA, M.; MEIER, U.C.; LOBELL, A. 2009. Regulation of autoimmune encephalomyelitis by toll-like receptors. **Autoimmunity Reviews**, **8 (6)**: 506-509.

- MARTINEZ, N.E.; SATO, F.; OMURA, S.; KAWAI, E.; TAKAHASHI, S.; YOH, K.; TSUNODA, I. 2014. ROR γ t, but not T-bet, overexpression exacerbates an autoimmune model for multiple sclerosis. **Journal of Neuroimmunology**, **276 (1-2)**: 142-149.
- MATEJUK, A.; DWYER, J.; HOPKE, C.; VANDENBARK, A.A.; OFFNER, H. 2003. 17Beta-estradiol treatment profoundly down-regulates gene expression in spinal cord tissue in mice protected from experimental autoimmune encephalomyelitis. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, **51 (3)**: 185-193.
- MATSUSHITA, T.; HORIKAWA, M.; IWATA, Y.; TEDDER, T.F. 2010. Regulatory B cells (B10 cells) and regulatory T cells have independent roles in controlling experimental autoimmune encephalomyelitis initiation and late-phase immunopathogenesis. **The Journal of Immunology**, **185 (4)**: 2240-2252.
- MATTHEWS, P.M. 2015. Decade in review-multiple sclerosis: new drugs and personalized medicine for multiple sclerosis. **Nature Reviews Neurology**, **11 (11)**: 614-616.
- MCKEAN, K.A.; NUNNEY, L. 2005. Bateman's principle and immunity: phenotypically plastic reproductive strategies predict changes in immunological sex differences. **Evolution**, **59 (7)**: 1510-1517.
- MEKALA, D.J.; GEIGER, T.L. 2005. Immunotherapy of autoimmune encephalomyelitis with redirected CD4+CD25+ T lymphocytes. **Blood**, **105 (5)**: 2090-2092.
- MENZE, E.T.; ESMAT, A.; TADROS, M.G.; ABDEL-NAIM, A.B.; KHALIFA, A.E. 2015. Genistein Improves 3-NPA-Induced Memory Impairment in Ovariectomized Rats: Impact of Its Antioxidant, Anti-Inflammatory and Acetylcholinesterase Modulatory Properties. **PLoS One**, **10 (2)**: e0117223.
- MESSINA, M. 2004. Western soy intake is too low to produce health effects. **The American Journal of Clinical Nutrition**, **80 (2)**: 528-529.
- MESSINA, M. 2010. Insights gained from 20 years of soy research. **The Journal of Nutrition**, **140 (12)**: 2289S-2295S.
- MEYERS, J.A.; MANGINI, A.J.; NAGAI, T.; ROFF, C.F.; SEHY, D.; VAN SEVENTER, G.A.; VAN SEVENTER, J.M. 2006. Blockade of TLR9 agonist-induced

type I interferons promotes inflammatory cytokine IFN-gamma and IL-17 secretion by activated human PBMC. **Cytokine**, **35 (5-6)**: 235-246.

MICHEL, L.; TOUIL, H.; PIKOR, N.B.; GOMMERMAN, J.L.; PRAT, A.; BAR-OR, A. 2015. B Cells in the Multiple Sclerosis Central Nervous System: Trafficking and Contribution to CNS-Compartmentalized Inflammation. **Frontiers in Immunology**, **6 (636)**: 1-12.

MICHEL, T.; HALABALAKI, M.; SKALTSOUNIS, A.L. 2013. New concepts, experimental approaches, and dereplication strategies for the discovery of novel phytoestrogens from natural sources. **Planta Medica**, **79 (7)**: 514-532.

MIELCARZ, D.W.; KASPER, L.H. 2015. The gut microbiome in multiple sclerosis. *Curr Treat Options Neurol*. **Current Treatment Options in Neurology**, **17 (4)**: 344.

MILLER, A.P.; FENG, W.; XING, D.; WEATHINGTON, N.M.; BLALOCK, J.E.; CHEN, Y.F.; OPARIL, S. 2004. Estrogen modulates inflammatory mediator expression and neutrophil chemotaxis in injured arteries. **Circulation**, **110 (12)**: 1664-1669.

MILO, R.; MILLER, A. 2014. Revised diagnostic criteria of multiple sclerosis. **Autoimmunity Reviews**, **13 (4-5)**: 518-524.

MIRANDA-HERNANDEZ, S.; BAXTER, A.G. 2013. Role of toll-like receptors in multiple sclerosis. **American Journal of Clinical and Experimental Immunology**, **2 (1)**: 75-93.

MISU, T.; ONODERA, H.; FUJIHARA, K.; MATSUSHIMA, K.; YOSHIE, O.; OKITA, N.; TAKASE, S.; ITOYAMA, Y. 2001. Chemokine receptor expression on T cells in blood and cerebrospinal fluid at relapse and remission of multiple sclerosis: imbalance of Th1/Th2-associated chemokine signaling. **Journal of Neuroimmunology**, **114 (1-2)**: 207-212.

MIX, E.; MEYER-RIENECKER, H.; ZETTL, U.K. 2008. Animal models of multiple sclerosis for the development and validation of novel therapies - potential and limitations. **Journal of Neurology**, **255 Suppl 6**: 7-14.

MIX, E.; MEYER-RIENECKER, H.; HARTUNG, H.P.; ZETTL, U.K. 2010. Animal models of multiple sclerosis--potentials and limitations. **Progress in Neurobiology**, **92 (3)**: 386-404.

MOHAMMADSHAHI, M.; HAIDARI, F.; SAEI, A.A.; RASHIDI, B.; MAHBOOB, S.; RASHIDI, M.R. 2013. Soy protein, genistein, and daidzein improve serum paraoxonase activity and lipid profiles in rheumatoid arthritis in rats. **Journal of Medicinal Food**, **16 (2)**: 147-154.

MONTERO, E.; NUSSBAUM, G.; KAYE, J.F.; PEREZ, R.; LAGE, A.; BEN-NUN, A.; COHEN, I.R. 2004. Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD4⁺, CD25⁺ and CD8⁺ T cells: analysis using depleting antibodies. **Journal of Autoimmunity**, **23 (1)**: 1-7.

MULTIPLE SCLEROSIS INTERNATIONAL FEDERATION. Atlas of MS 2013: **Mapping Multiple Sclerosis Around the World, London: 2013.**

MÜNZ, C.; LÜNEMANN, J.D.; GETTS, M.T.; MILLER, S.D. 2009. Antiviral immune responses: triggers of or triggered by autoimmunity? **Nature Reviews Immunology**, **9 (4)**: 246-258.

MURARO, P.A.; LEIST, T.; BIELEKOVA, B.; MCFARLAND, H.F. 2000. VLA-4/CD49d downregulated on primed T lymphocytes during interferon- β therapy in multiple sclerosis. **Journal of Neuroimmunology**, **111 (1-2)**: 186-194.

NAGTEGAAL, G.J.; POHL, C.; WATTJES, M.P.; HULST, H.E.; FREEDMAN, M.S.; HARTUNG, H.P.; MILLER, D.; MONTALBAN, X.; KAPPOS, L.; EDAN, G.; PLEIMES, D.; BECKMAN, K.; STEMPER, B.; POLMAN, C.H.; SANDBRINK, R.; BARKHOF, F. 2014. Interferon beta-1b reduces black holes in a randomised trial of clinically isolated syndrome. **Multiple Sclerosis Journal**, **20 (2)**: 234-242.

NAGYOSZI, P.; WILHELM, I.; FARKAS, A.E.; FAZAKAS, C.; DUNG, N.T.; HASKÓ, J.; KRIZBAI, I.A. 2010. Expression and regulation of toll-like receptors in cerebral endothelial cells. **Neurochemistry International**, **57 (5)**: 556-564.

NAKAJIMA, H.; FUKUDA, K.; DOI, Y.; SUGINO, M.; KIMURA, F.; HANAFUSA, T.; IKEMOTO, T.; SHIMIZU, A. 2004. Expression of TH1/TH2-related chemokine receptors on peripheral T cells and correlation with clinical disease activity in patients with multiple sclerosis. **European Neurology**, **52 (3)**: 162-168.

NATIONAL MULTIPLE SCLEROSIS SOCIETY. 2012. About MS: what we know about MS. <http://www.nationalmssociety.org/about-multiplesclerosis/>.

NAVRATILOVA, Z. 2006. Polymorphisms in CCL2 and CCL5 chemokines/chemokine receptor genes and their association with diseases. **Biomedical Papers of the**

Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia, 150 (2): 191-204.

NEF, S.; PARADA, L.F. 2000. Hormones in male sexual development. **Genes & Development, 14 (24):** 3075-3086.

NING, Y.X.; LI, Q.X.; REN, K.Q.; QUAN, M.F.; CAO, J.G. 2014. 7-difluoromethoxyl-5,4'-di-n-octyl genistein inhibits ovarian cancer stem cell characteristics through the downregulation of FOXM1. **Oncology Letters, 8 (1):** 295-300.

OCHOA-REPÁRAZ, J.; MIELCARZ, D.W.; DITRIO, L.E.; BURROUGHS, A.R.; BEGUM-HAQUE, S.; DASGUPTA, S.; KASPER, D.L.; KASPER, L.H. 2010. Central nervous system demyelinating disease protection by the human commensal *Bacteroides fragilis* depends on polysaccharide A expression. **The Journal of Immunology, 185 (7):** 4101-4108.

O'CONNOR, R.A.; PRENDERGAST, C.T.; SABATOS, C.A.; LAU, C.W.; LEECH, M.D.; WRAITH, D.C.; ANDERTON, S.M. 2008. Cutting edge: Th1 cells facilitate the entry of Th17 cells to the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. **The Journal of Immunology, 181 (6):** 3750-3754.

OLSON, J.K.; LUDOVIC CROXFORD, J.; MILLER, S.D. 2004. Innate and adaptive immune requirements for induction of autoimmune demyelinating disease by molecular mimicry. **Molecular Immunology, 40 (14-15):** 1103-1108.

OREJA-GUEVARA, C.; RAMOS-CEJUDO, J.; AROEIRA, L.S.; CHAMORRO, B.; DIEZ-TEJEDOR, E. 2012. TH1/TH2 Cytokine profile in relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with Glatiramer acetate or Natalizumab. **BMC Neurology, 12:** 1-6.

OSHIUMI, H.; MATSUMOTO, M.; FUNAMI, K.; AKAZAWA, T.; SEYA, T. 2003. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. **Nature Immunology, 4 (2):** 161-167.

PAGANINI-HILL, A. 2001. Hormone replacement therapy and stroke: risk, protection or no effect? **Maturitas, 38 (3):** 243-261.

PALANISAMY, N.; KANNAPPAN, S.; ANURADHA, C.V. 2011. Genistein modulates NF-kappaB-associated renal inflammation, fibrosis and podocyte abnormalities in fructose-fed rats. **European Journal of Pharmacology, 667 (1-3):** 355-364.

PANTAZOU, V.; SCHLUEP, M.; DU PASQUIER, R. 2015. Environmental factors in multiple sclerosis. **Presse Médicale**, **44 (4 Pt 2)**: e113-20.

PARE, G.; KRUST, A.; KARAS, R.H.; DUPONT, S.; ARONOVITZ, M.; CHAMBON, P.; MENDELSON, M.E. 2002. Estrogen receptor-alpha mediates the protective effects of estrogen against vascular injury. **Circulation Research**, **90 (10)**: 1087-1092.

PARKER, D.; PRINCE, A. 2012. Staphylococcus aureus induces type I IFN signaling in dendritic cells via TLR9. **The Journal of Immunology**, **189 (8)**: 4040-4046.

PENDER, M.P.; GREER, J.M. 2007. Immunology of multiple sclerosis. Current allergy and asthma reports. **Current Allergy and Asthma Reports**, **7 (4)**: 285-292.

PERKINS, D.J.; VOGEL, S.N. 2015. Space and time: New considerations about the relationship between Toll-like receptors (TLRs) and type I interferons (IFNs). **Cytokine**, **74 (2)**: 171-174.

PETTERSSON, A.; CIUMAS, C.; CHIRSKY, V.; LINK, H.; HUANG, Y.M.; XIAO, B.G. 2004. Dendritic cells exposed to estrogen in vitro exhibit therapeutic effects in ongoing experimental allergic encephalomyelitis. **Journal of Neuroimmunology**, **156 (1-2)**: 58-65.

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

PITTOCK, S.J.; LUCCHINETTI, C.F. 2007. The pathology of MS: new insights and potential clinical applications. **The Neurologist**, **13 (2)**: 45-56.

POLLARD, M.; SUCKOW, M.A. 2006. Dietary prevention of hormone refractory prostate cancer in Lobund-Wistar rats: a review of studies in a relevant animal model. **Comparative Medicine**, **56 (6)**: 461-467.

POLMAN, C.H.; REINGOLD, S.C.; BANWELL, B.; CLANET, M.; COHEN, J.A.; FILIPPI, M.; FUJIHARA, K.; HAVRDOVA, E.; HUTCHINSON, M.; KAPPOS, L.; LUBLIN, F.D.; MONTALBAN, X.; O'CONNOR, P.; SANDBERG-WOLLHEIM, M.; THOMPSON, A.J.; WAUBANT, E.; WEINSHENKER, B.; WOLINSKY, J.S. 2011.

Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. **Annals of Neurology**, **69 (2)**: 292-302.

PÖTZL, J.; BOTTERON, C.; TAUSCH, E.; PEDRÉ, X.; MUELLER, A.M.; MÄNNEL, D.N.; LECHNER, A. 2008. Tracing functional antigen-specific CCR6 Th17 cells after vaccination. **PLoS One**, **3 (8)**: e2951. 1-9

PRINZ, M.; SCHMIDT, H.; MILDNER, A.; KNOBELOCH, K.P.; HANISCH, U.K.; RAASCH, J.; MERKLER, D.; DETJE, C.; GUTCHER, I.; MAGES, J.; LANG, R.; MARTIN, R.; GOLD, R.; BECHER, B.; BRÜCK, W.; KALINKE, U. 2008. Distinct and nonredundant in vivo functions of IFNAR on myeloid cells limit autoimmunity in the central nervous system. **Immunity**, **28 (5)**: 675-686.

PROUDFOOT, A.E.; DE SOUZA, A.L.; MUZIO, V. 2008. The use of chemokine antagonists in EAE models. **Journal of Neuroimmunology**, **198 (1-2)**: 27-30.

PUTHETI, P.; SODERSTROM, M.; LINK, H.; HUANG, Y.M. 2003. Effect of glatiramer acetate (Copaxone) on CD4⁺CD25^{high} T regulatory cells and their IL-10 production in multiple sclerosis. **Journal of Neuroimmunology**, **144 (1-2)**: 125-131.

QIN, L.Q.; XU, J.Y.; WANG, P.Y.; HOSHI, K. 2006. Soyfood intake in the prevention of breast cancer risk in women: a meta-analysis of observational epidemiological studies. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, **52 (6)**: 428-436.

RACKE, M.K.; HU, W.; LOVETT-RACKE, A.E. 2005. PTX cruiser: driving autoimmunity via TLR4. **Trends in Immunology**, **26 (6)**: 289-291.

RAGERDI KASHANI, I.; HEDAYATPOUR, A.; PASBAKHSH, P.; KAFAMI, L.; ATLASI, N.; PIRHAJATI MAHABADI, V.; MAMOUDI, R.; BAAZM, M. 2012. 17β-Estradiol enhances the efficacy of adipose-derived mesenchymal stem cells on remyelination in mouse model of multiple sclerosis. **Acta Medica Iranica**, **50 (12)**: 789-797.

RAMGOLAM, V.S.; MARKOVIC-PLESE, S. 2010. Interferon-beta inhibits Th17 cell differentiation in patients with multiple sclerosis. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders Drug Targets**, **10 (2)**: 161-167.

RATCHFORD, J.N.; BROCK-SIMMONS, R.; AUGSBURGER, A.; STEELE, S.U.; MOHN, K.; RHONE, M.; BO, J.; COSTELLO, K. 2014. Multiple sclerosis symptom recrudescence at the end of the natalizumab dosing cycle. **International Journal of MS Care**, **16 (2)**: 92-98.

RAZEGHI JAHROMI, S.; ARREFHOSSEINI, S.R.; GHAEMI, A.; ALIZADEH, A.; MORADI TABRIZ, H.; TOGHA, M. 2014. Alleviation of experimental allergic encephalomyelitis in C57BL/6 mice by soy daidzein. **Iranian Journal of Allergy, Asthma, and Immunology**, **13 (4)**: 256-264.

REBOLDI, A.; COISNE, C.; BAUMJOHANN, D.; BENVENUTO, F.; BOTTINELLI, D.; LIRA, S.; UCCELLI, A.; LANZAVECCHIA, A.; ENGELHARDT, B.; SALLUSTO, F. 2009. C-Cchemokine receptor6-regulated entry of TH-17cells into the CNS Through the choroid plexus is required for the in itiation of EAE. **Nature Immunology**, **10 (5)**: 514-523.

REYNOLDS, J.M.; MARTINEZ, G.J.; CHUNG, Y.; DONG, C. 2012. Toll-like receptor 4 signaling in T cells promotes autoimmune inflammation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **109 (32)**: 13064-13069.

RHONDA, R.; VOSKUHL, M.D.; STEFAN, M. 2012. Sex-related Factors in Multiple Sclerosis: Genetic, Hormonal and Environmental Contributions. **Nature Reviews Neurology**, **8 (5)**: 255–263.

RICCIO, P.; ROSSANO, R. 2015. Nutrition facts in multiple sclerosis. **American Society for Neurochemistry neuro**, **7 (1)**: 1-20.

RICCIO, P.; ROSSANO, R.; LIUZZI, G.M. 2010. May diet and dietary supplements improve the wellness of multiple sclerosis patients? A molecular approach. **Autoimmune Diseases**, **2010**: 1-12.

RIZZO, R.; GENTILI, V.; CASETTA, I.; CASELLI, E.; DE GENNARO, R.; GRANIERI, E.; CASSAI, E.; DI LUCA, D.; ROTOLA, A. 2012. Altered natural killer cells' response to herpes virus infection in multiple sclerosis involves KIR2DL2 expression. **Journal of Neuroimmunology**, **251(1-2)**: 55-64.

ROTONDO, S.; KRAUZE-BRZÓSKO, K.; MANARINI, S.; MARTELLI, N.; PECCE, R.; EVANGELISTA, V.; BENEDETTA DONATI, M.; CERLETTI, C. 2008. Inhibition by soya isoflavones of human polymorphonuclear leukocyte function: possible relevance for the beneficial effects of soya intake. **The British Journal of Nutrition**, **99 (2)**: 240-247.

RUBTSOVA, K.; MARRACK, P.; RUBTSOV, A.V. 2015. Sexual dimorphism in autoimmunity. **The Journal of Clinical Investigation**, **125 (6)**: 2187-2193.

- SAIJO, K.; COLLIER, J.G.; LI, A.C.; KATZENELLENBOGEN, J.A.; GLASS, C.K. 2011. An ADIOL-ER β -CtBP transrepression pathway negatively regulates microglia-mediated inflammation. **Cell**, **145 (4)**: 584-595.
- SAXENA, A.; BAUER, J.; SCHEIKL, T.; ZAPPULLA, J.; AUDEBERT, M.; DESBOIS, S.; WAISMAN, A.; LASSMANN, H.; LIBLAU, R.S.; MARS, L.T. 2008. Cutting edge: Multiple sclerosis-like lesions induced by effector CD8 T cells recognizing a sequestered antigen on oligodendrocytes. **The Journal of Immunology**, **181 (3)**: 1617-1621.
- SCALFARI, A.; NEUHAUS, A.; DAUMER, M.; MURARO, P.A.; EBERS, G.C. 2014. Onset of secondary progressive phase and long-term evolution of multiple sclerosis. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, **85 (1)**: 67-75.
- SCHMIDT, J.; GOLD, R.; SCHÖNROCK, L.; ZETTL, U.K.; HARTUNG, H.P.; TOYKA, K.V. 2000. T cell apoptosis in situ in experimental autoimmune encephalomyelitis following methylprednisolone pulse therapy. **Brain**, **123 (Pt 7)**: 1431-1441.
- SCHULZ, E.G.; MARIANI, L.; RADBRUCH, A.; HÖFER, T. 2009. Sequential polarization and imprinting of type 1 T helper lymphocytes by interferon-gamma and interleukin-12. **Immunity**, **30 (5)**: 673-683.
- SEGAL, B.M. 2003. Experimental autoimmune encephalomyelitis: cytokines, effector T cells, and antigen-presenting cells in a prototypical Th1-mediated autoimmune disease. **Current Allergy and Asthma Reports**, **3 (1)**: 86-93.
- SERAFINI, B.; ROSICARELLI, B.; FRANCIOTTA, D.; MAGLIOZZI, R.; REYNOLDS, R.; CINQUE, P.; ANDREONI, L.; TRIVEDI, P.; SALVETTI, M.; FAGGIONI, A.; ALOISI, F. 2007. Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain. **The Journal of Experimental Medicine**, **204 (12)**: 2899-2912.
- SHACHAR, I.; KARIN, N. 2013. The dual roles of inflammatory cytokines and chemokines in the regulation of autoimmune diseases and their clinical implications. **Journal of Leukocyte Biology**, **93 (1)**: 51-61.
- SHAMBAYATI, M.; PATEL, M.; MA, Y.; CUNNINGHAM, R.L.; SCHREIHOFER, D.A. 2014. Central inflammatory response to experimental stroke is inhibited by a neuroprotective dose of dietary soy. **Brain Research**, **1593**: 76-82.

SHARMA, P.K.; THAKUR, M.K. 2006. Expression of estrogen receptor (ER) alpha and beta in mouse cerebral cortex: effect of age, sex and gonadal steroids. **Neurobiology of Aging**, **27 (6)**: 880-887.

SHEVACH, E.M. 2009. Mechanisms of foxp3⁺ T regulatory cell-mediated suppression. **Immunity**, **30 (5)**: 636-645.

SHI, D.H.; YAN, Z.Q.; ZHANG, L.N.; WANG, Y.R.; JIANG, C.P.; WU, J.H. 2012. A novel 7-O-modified genistein derivative with acetylcholinesterase inhibitory effect, estrogenic activity and neuroprotective effect. **Archives of Pharmacal Research**, **35 (9)**: 1645-1654.

SINGH, S.P.; ZHANG, H.H.; FOLEY, J.F.; HEDRICK, M.N.; FARBER, J.M. 2008. Human T cells that are able to produce IL-17 express the chemokine receptor CCR6. **The Journal of Immunology**, **180 (1)**: 214-221.

SIROTKIN, A.V.; HARRATH, A.H. 2014. Phytoestrogens and their effects. **European Journal of Pharmacology**, **741**: 230-236.

SKULINA, C.; SCHMIDT, S.; DORNMAIR, K.; BABBE, H.; ROERS, A.; RAJEWSKY, K.; WEKERLE, H.; HOHLFELD, R.; GOEBELS, N. 2004. Multiple sclerosis: brain-infiltrating CD8⁺ T cells persist as clonal expansions in the cerebrospinal fluid and blood. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **101 (8)**: 2428-2433.

SLOANE, J.A.; BATT, C.; MA, Y.; HARRIS, Z.M.; TRAPP, B.; VARTANIAN, T. 2010. Hyaluronan blocks oligodendrocyte progenitor maturation and remyelination through TLR2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **107 (25)**: 11555-11560.

SONG, J.; GUAN, M.; ZHAO, Z.; ZHANG, J. 2015. Type I Interferons Function as Autocrine and Paracrine Factors to Induce Autotaxin in Response to TLR Activation. **PLoS One**, **10 (8)**: e0136629 1-22.

SØRENSEN, T.L.; TANI, M.; JENSEN, J.; PIERCE, V.; LUCCHINETTI, C.; FOLCIK, V.A.; QIN, S.; ROTTMAN, J.; SELLEBJERG, F.; STRIETER, R.M.; FREDERIKSEN, J.L.; RANSOHOFF, R.M. 1999. Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. **The Journal of Clinical Investigation**, **103 (6)**: 807-815.

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

SOUICY, N.V.; PARKINSON, H.D.; SOCHASKI, M.A.; BORGHOFF, S.J. 2006. Kinetics of genistein and its conjugated metabolites in pregnant Sprague-Dawley rats following single and repeated genistein administration. **Toxicological Sciences**, **90 (1)**: 230-240.

SPANIER, J.A.; NASHOLD, F.E.; MAYNE, C.G.; NELSON, C.D.; HAYES, C.E. 2015. Vitamin D and estrogen synergy in Vdr-expressing CD4(+) T cells is essential to induce Helios(+)FoxP3(+) T cells and prevent autoimmune demyelinating disease. **Journal of Neuroimmunology**, **286**: 48-58.

SPENCER, J.L.; WATERS, E.M.; ROMEO, R.D.; WOOD, G.E.; MILNER, T.A.; MCEWEN, B.S. 2008. Uncovering the mechanisms of estrogen effects on hippocampal function. **Frontiers in Neuroendocrinology**, **29 (2)**: 219-237.

SRIBNICK, E.A.; RAY, S.K.; BANIK, N.L. 2004. Estrogen as a multi-active neuroprotective agent in traumatic injuries. **Neurochemical Research**, **29 (11)**: 2007-2014.

STEELMAN, A.J. 2015. Infection as an Environmental Trigger of Multiple Sclerosis Disease Exacerbation. **Frontiers in Immunology**, **6**: 520.

STEINMAN, L.; ZAMVIL, S.S. 2006. How to successfully apply animal studies in experimental allergic encephalomyelitis to research on multiple sclerosis. **Annals of Neurology**, **60 (1)**: 12-21.

STRAUB, R.H. 2007. The complex role of estrogens in inflammation. **Endocrine Reviews**, **28 (5)**: 521-574.

STROMNES, I.M.; GOVERMAN, J.M. 2006. Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. **Nature Protocols**, **1 (4)**: 1810-1819a.

STROMNES, I.M.; GOVERMAN, J.M. 2006. Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis. **Nature Protocols**, **1 (4)**: 1952-1960b.

STROMNES, I.M.; CERRETTI, L.M.; LIGGITT, D.; HARRIS, R.A.; GOVERMAN, J.M. 2008. Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T(H)1 and T(H)17 cells. **Nature Medicine**, **14 (3)**: 337-342.

SUBRAMANIAN, S.; MATEJUK, A.; ZAMORA, A.; VANDENBARK, A.A.; OFFNER, H. 2003. Oral feeding with ethinyl estradiol suppresses and treats experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL mice and inhibits the recruitment of inflammatory cells into the central nervous system. **The Journal of Immunology**, **170 (3)**: 1548-1555.

SZCZUCIŃSKI, A.; LOSY, J. 2007. Chemokines and chemokine receptors in multiple sclerosis. Potential targets for new therapies. **Acta Neurologica Scandinavica**, **115 (3)**: 137-146.

THAKUR, M.K.; SHARMA, P.K. 2006. Aging of brain: role of estrogen. **Neurochemical Research**, **31 (11)**: 1389-1398.

THAM, D.M.; GARDNER, C.D.; HASKELL, W.L. 1998. Clinical review 97: Potential health benefits of dietary phytoestrogens: a review of the clinical, epidemiological, and mechanistic evidence. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, **83 (7)**: 2223-2235.

TIGNO-ARANJUEZ, J.T.; JAINI, R.; TUOHY, V.K.; LEHMANN, P.V.; TARY-LEHMANN, M. 2009. Encephalitogenicity of complete Freund's adjuvant relative to CpG is linked to induction of Th17 cells. **The Journal of Immunology**, **183 (9)**: 5654-5661.

TIWARI-WOODRUFF, S.; VOSKUHL, R.R. 2009. Neuroprotective and anti-inflammatory effects of estrogen receptor ligand treatment in mice. **Journal of the Neurological Sciences Sci**, **286 (1-2)**: 81-85.

TOUIL, T.; FITZGERALD, D.; ZHANG, G.X.; ROSTAMI, A.; GRAN, B. 2006. Cutting edge: TLR3 stimulation suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis by inducing endogenous IFN- β . **Journal of Immunology**, **177 (11)**: 7505-7509.

TROJANO, M.; LUCCHESI, G.; GRAZIANO, G.; TAYLOR, B.V.; SIMPSON, S.JR.; LEPORE, V.; GRAND'MAISON, F.; DUQUETTE, P.; IZQUIERDO, G.; GRAMMOND, P.; AMATO, M.P.; BERGAMASCHI, R.; GIULIANI, G.; BOZ, C.; HUPPERTS, R.; VAN PESCH, V.; LECHNER-SCOTT, J.; CRISTIANO, E.; FIOLE, M.; OREJA-GUEVARA, C.; SALADINO, M.L.; VERHEUL, F.; SLEE, M.; PAOLICELLI, D.; TORTORELLA, C.; D'ONGHIA, M.; IAFFALDANO, P.; DIRENZO, V.; BUTZKUEVEN, H.; MS BASE STUDY GROUP AND THE NEW ZEALAND MS PREVALENCE STUDY GROUP. 2012. Geographical variations in sex ratio trends over time in multiple sclerosis. **PLoS One**, **7 (10)**: e48078.

TROJANO, M.; PAOLICELLI, D.; TORTORELLA, C.; IAFFALDANO, P.; LUCCHESI, G.; DI RENZO, V.; D'ONGHIA, M. 2011. Natural history of multiple sclerosis: have available therapies impacted long-term prognosis? **Neurologic Clinics**, **29 (2)**: 309-321.

TSAREVA, E.; KULAKOVA, O.; BOYKO, A.; FAVOROVA, O. 2016. Pharmacogenetics of multiple sclerosis: personalized therapy with immunomodulatory drugs. **Pharmacogenetics and Genomics**, **26 (3)**: 103-115.

UBOGU, E.E.; COSSOY, M.B.; RANSOHOFF, R.M. 2006. The expression and function of chemokines involved in CNS inflammation. **Trends in Pharmacological Sciences**, **27 (1)**: 48-55.

ULZHEIMER, J.C.; MEUTH, S.G.; BITTNER, S.; KLEINSCHNITZ, C.; KIESEIER, B.C.; WIENDL, H. 2010. Therapeutic approaches to multiple sclerosis: an update on failed, interrupted, or inconclusive trials of immunomodulatory treatment strategies. **BioDrugs**, **24 (4)**: 249-274.

VAN DER STAR, B.J.; VOGEL, D.Y.; KIPP, M.; PUENTES, F.; BAKER, D.; AMOR, S. 2012. In vitro and in vivo models of multiple sclerosis. **CNS & Neurological Disorders Drug Targets**, **11 (5)**: 570-588.

VEGETO, E.; BELCREDITO, S.; ETTERI, S.; GHISLETTI, S.; BRUSADELLI, A.; MEDA, C.; KRUST, A.; DUPONT, S.; CIANA, P.; CHAMBON, P.; MAGGI, A. 2003. Estrogen receptor-alpha mediates the brain antiinflammatory activity of estradiol. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **100 (16)**: 9614-9619.

VERCELLINO, M.; VOTTA, B.; CONDELLO, C.; PIACENTINO, C.; ROMAGNOLO, A.; MEROLA, A.; CAPELLO, E.; MANCARDI, G.L.; MUTANI, R.; GIORDANA, M.T.; CAVALLA, P. 2008. Involvement of the choroid plexus in multiple sclerosis autoimmune inflammation: a neuropathological study. **Journal of Neuroimmunology**, **199 (1-2)**: 133-141.

VERDRENGH, M.; JONSSON, I.M.; HOLMDAHL, R.; TARKOWSKI, A. 2003. Genistein as an anti-inflammatory agent. **Inflammation Research**, **52 (8)**: 341-346.

VIEIRA, S.M.; PAGOVIK, O.E.; KRIEGEL, M.A. 2014. Diet, microbiota and autoimmune diseases. **Lupus**, **23 (6)**: 518-526.

VIGLIETTA, V.; BAECHER-ALLAN, C.; WEINER, H.L.; HAFNER, D.A. 2004. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. **The Journal of Experimental Medicine**, **199 (7)**: 971-979.

VIGNALI, D.A.; COLLISON, L.W.; WORKMAN, C.J. 2008. How regulatory T cells work. **Nature Reviews Immunology**, **8 (7)**: 523-532.

VINCENT, C.M.; GWYNNE, D.T. 2014. Sex-biased immunity is driven by relative differences in reproductive investment. **Proceedings. Biological sciences /The Royal Society**, **281(1790)**: pii: 20140333.

VOSOUGHI, R.; FREEDMAN, M.S. 2010. Therapy of MS. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, **112 (5)**: 365-385.

WANG, D.; LI, S.P.; FU, J.S.; BAI, L.; GUO, L. 2016. Resveratrol augments therapeutic efficiency of mouse bone marrow mesenchymal stem cell-based therapy in experimental autoimmune encephalomyelitis. **International Journal of Developmental Neuroscience**, **49**: 60-66.

WANG, J.; JENKINS, S.; LAMARTINIERE, C.A. 2014. Cell proliferation and apoptosis in rat mammary glands following combinational exposure to bisphenol A and genistein. **BMC Cancer**, **14**: 379.

WANG, J.G.; RUAN, J.; LI, C.Y.; WANG, J.M.; LI, Y.; ZHAI, W.T.; ZHANG, W.; YE, H.; SHEN, N.H.; LEI, K.F.; CHEN, X.F.; YANG, X.Y. 2011. Connective tissue growth factor, a regulator related with 10-hydroxy-2-decenoic acid down-regulate MMPs in rheumatoid arthritis. **Rheumatology International**, **32 (9)**: 2791-2799.

WANG, Z.Y.; YANG, D.; CHEN, Q.; LEIFER, C.A.; SEGAL, D.M.; SU, S.B.; CASPI, R.R.; HOWARD, Z.O.; OPPENHEIM, J.J. 2006. Induction of dendritic cell maturation by pertussis toxin and its B subunit differentially initiate Toll-like receptor 4-dependent signal transduction pathways. **Experimental Hematology**, **34 (8)**: 1115-1124.

WEAVER, C.T.; HARRINGTON, L.E.; MANGAN, P.R.; GAVRIELI, M.; MURPHY, K.M. 2006. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. **Immunity**, **24 (6)**: 677-688.

WEINER, H.L. 2008. A shift from adaptive to innate immunity: a potential mechanism of disease progression in multiple sclerosis. **Journal of Neurology**, **255 Suppl 1**: 3-11.

WIENDL, H.; HOHLFELD, R. 2009. Multiple sclerosis therapeutics: unexpected outcomes clouding undisputed successes. **Neurology**, **72 (11)**: 1008-1015.

WILLIAMS, L.M.; RUDENSKY, A.Y. 2007. Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. **Nature Immunology**, **8 (3)**: 277-84.

WOLF, N.A.; AMOUZEGAR, T.K.; SWANBORG, R.H. 2007. Synergistic interaction between Toll-like receptor agonists is required for induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats. **Journal of Neuroimmunology**, **185 (1-2)**: 115-122.

WRAITH, D.C.; NICOLSON, K.S.; WHITLEY, N.T. 2004. Regulatory CD4+ T cells and the control of autoimmune disease. **Current Opinion in Immunology**, **16 (6)**: 695-701.

WU, W.F.; TAN, X.J.; DAI, Y.B.; KRISHNAN, V.; WARNER, M.; GUSTAFSSON, J.Å. 2013. Targeting estrogen receptor β in microglia and T cells to treat experimental autoimmune encephalomyelitis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **110 (9)**: 3543-3548.

XIAO, J.; LIU, W.; CHEN, Y.; DENG, W. 2015. Recombinant human PDCD5 (rhPDCD5) protein is protective in a mouse model of multiple sclerosis. **Journal of Neuroinflammation**, **12**: 117.

XIE, C.; CIRIC, B.; YU, S.; ZHANG, G.X.; ROSTAMI, A. 2016. IL-12R β 2 has a protective role in relapsing-remitting experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Neuroimmunology**, **291**: 59-69.

YAMAMOTO, M.; SATO, S.; HEMMI, H.; HOSHINO, K.; KAISHO, T.; SANJO, H.; TAKEUCHI, O.; SUGIYAMA, M.; OKABE, M.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. **Science**, **301 (5633)**: 640-643.

YOKOTE, H.; MIYAKE, S.; LUDOVIC CROXFORD, J.; OKI, S.; MIZUSAWA, H.; YAMAMURA, T. 2008. NKT Cell-Dependent Amelioration of a Mouse Model of Multiple Sclerosis by Altering Gut Flora. **The American Journal of Pathology**, **173 (6)**: 1714-1723.

ZAHEER, K.; HUMAYOUN AKHTAR, M. 2015. An Updated Review of Dietary Isoflavones: Nutrition, Processing, Bioavailability and Impacts on Human Health. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. In Press

ZANDMAN-GODDARD, G.; PEEVA, E.; SHOENFELD, Y. 2007. Gender and autoimmunity. **Autoimmunity Reviews**, **6 (6)**: 366-372.

ZHANG, L.; YUAN, S.; CHENG, G.; GUO, B. 2011. Type I IFN promotes IL-10 production from T cells to suppress Th17 cells and Th17-associated autoimmune inflammation. **PLoS One**, **6 (12)**: e28432.

ZHANG, Z.Y.; ZHANG, Z.; SCHLUESENER, H.J. 2009. Toll-like receptor-2, CD14 and heat-shock protein 70 in inflammatory lesions of rat experimental autoimmune neuritis. **Neuroscience**, **159 (1)**: 136-142.

ZHOU, X.; KONG, N.; ZOU, H.; BRAND, D.; LI, X.; LIU, Z.; ZHENG, S.G. 2011. Therapeutic potential of TGF beta- induced CD4(+) Foxp3(+) regulatory T cells in autoimmune diseases. **Autoimmunity**, **44 (1)**: 43-50.