

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

**Sandra Bertelli Ribeiro de Castro**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DERIVADOS LIPOFÍLICOS DA  
GENISTEÍNA NA ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS *IN VITRO* E NA  
MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE NO MODELO DE EAE**

Juiz de Fora

2011

**SANDRA BERTELLI RIBEIRO DE CASTRO**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DERIVADOS LIPOFÍLICOS DA  
GENISTEÍNA NA ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS *IN VITRO* E NA  
MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE NO MODELO DE EAE**

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

**Orientador: Profa. Dra. Ana Paula Ferreira**

**Co-Orientador: Prof. Dr. Mauro Vieira de Almeida**

Juiz de Fora

2011

# **SANDRA BERTELLI RIBEIRO DE CASTRO**

## **AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DERIVADOS LIPOFÍLICOS DA GENISTEÍNA NA ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS *IN VITRO* E NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE NO MODELO DE EAE**

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

### **BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dra. Ana Paula Ferreira, Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Universidade Federal de Juiz de Fora.

---

Prof. Dra. Maria Aparecida de Souza, Departamento de Patologia, Universidade Federal de Uberlândia.

---

Prof. Dr. Rafael Machado Rezende, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais.

---

Prof. Dra. Jacy Gameiro, Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Universidade Federal de Juiz de Fora.

---

Prof. Dra. Alice Belleigoli Rezende, Departamento de Anatomia, Universidade Federal de Juiz de Fora.

*Dedico esta tese a todos que trabalham  
para a ciência com humildade e ética,  
ciente que não somos criadores,  
mas apenas tentamos entender  
e às vezes por necessidade controlar e  
nos beneficiar do que já existe.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Deus por ter me proporcionado saúde, concentração, equilíbrio e persistência para a realização desta pesquisa. À Santa Tereza para quem eu rezo e peço eterna proteção.

Aos meus pais Roosevelt e Márcia que me educaram com sabedoria, integridade e simplicidade, vocês serão para mim os melhores exemplos de vida, pois não existe nenhum momento que passamos juntos que possa ser apagado da minha memória. Agradeço pai e mãe por entenderem a minha dedicação e me ajudarem a concluir esta jornada.

A minha orientadora Profa. Dra. Ana Paula Ferreira, por confiar no meu trabalho, permitir e proporcionar o meu amadurecimento científico e profissional, por me ensinar a postura correta diante das mais diversas situações.

Ao meu amigo Caio César de Souza Alves que me ensinou com paciência e desprendimento a maior parte das técnicas utilizadas na realização deste trabalho. Por me ajudar constantemente a solucionar situações complicadas, por ter entrado na minha vida profissional como um amigo, por ter construído comigo cada página desta tese.

As minhas amigas de laboratório Alyria, pela solidariedade nas noites de experimento, Alessa, pelas conversas e incertezas resolvidas, e Ana Cláudia, pela atitude maternal, a todas pelo apoio, pelo carinho, pela cumplicidade e atenção.

Aos professores e amigos do Laboratório de Imunologia pelo apoio. Em especial a Marcilene, Luan e Lívia pela prontidão em me ajudar. Ao professor Dr. Henrique Couto Teixeira, pela paciência e dedicação na correção dos artigos. Ao meu amigo Luciano pelo apoio e ensinamentos.

Ao professor Dr. Mauro Vieira de Almeida responsável pela a elaboração das moléculas utilizadas neste estudo. Ao Celso de Oliveira Rezende Junior responsável pela síntese dos compostos utilizados neste experimento, pela oportunidade.

Agradeço ao meu amor Nicodemos José de Oliveira pela paciência nos momentos difíceis, pela dedicação na educação da nossa filha Emanuela Ribeiro Oliveira durante meus períodos ausentes.

Agradeço a minha filha Emanuela Ribeiro Oliveira que mesmo sendo tão pequena, demonstra compreensão mediante meu cansaço ou impaciência. Espero poder retificar cada momento da minha ausência.

As minhas irmãs Simone e Cintia pela amizade, compreensão e constante ajuda.

A minha madrinha Bernadete que sempre me socorreu nos momentos atribulados.

Aos amigos do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia pelo auxílio em diversos momentos.

À CAPES, ao CNPq e à FAPEMIG pelo suporte financeiro fornecido ao projeto.

*“Obstáculos são aquelas coisas medonhas que você vê quando tira os  
olhos do seu objetivo”*

*Henry Ford*

## RESUMO

A Esclerose Múltipla (EM) caracteriza-se por ser uma doença inflamatória crônica desmielinizante do Sistema Nervoso Central (SNC), que afeta aproximadamente um milhão de pessoas em todo o mundo. Entre os agentes terapêuticos aprovados atualmente para o tratamento da EM podemos citar o interferon beta (IFN- $\beta$ ) e o acetato de glatirâmer, entretanto, estes agentes não promovem a cura da doença ou a recuperação total dos pacientes que estão em fase avançada. Diversos estudos demonstram a propriedade que os hormônios sexuais, como o estradiol e progesterona possuem em diminuir a gravidade da Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE). Estruturalmente, as isoflavonas compartilham muitas similaridades com os estrógenos endógenos. Estudos realizados com genisteína mostram os efeitos benéficos deste isoflavonóide na EAE. Entretanto, alguns fatores limitam sua aplicação clínica, como por exemplo, sua rápida excreção e declínio dos níveis séricos, sendo que estas características podem estar relacionadas à sua estrutura química. Dentro deste contexto, este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito de sete derivados lipofílicos da genisteína na modulação da resposta *in vitro* de macrófagos murinos J774.A1 ativados com lipopolissacarídeo e IFN- $\gamma$ , e verificar a atuação de um análogo selecionado na etapa *in vitro* na modulação da resposta imune *in vivo* no modelo de EAE. Na etapa *in vitro* foi avaliada a citotoxicidade dos compostos, no sobrenadante da cultura foram dosados óxido nítrico, IL-12 e TNF- $\alpha$ . Na etapa *in vivo* foi investigado o uso do derivado da genisteína **3** (7-O-tetradecanoil-genisteína – TDG) na evolução da EAE induzida em camundongos C57Bl/6 através da aplicação do MOG<sub>35-55</sub>. No 14º dia após a indução com o MOG, os camundongos foram tratados com TDG por sete dias. No 21º dia após a indução, as porcentagens de células mononucleares isoladas de cérebro expressando marcadores de superfície (CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> e CTLA-4) e produzindo citocinas IL-17<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, IL-10<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> ou fator de transcrição Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> foram determinadas por citometria de fluxo. A concentração de IL-6, IFN- $\gamma$  e IL-10 em macerado de cérebro e medula foram determinadas por ELISA. As análises histológicas de cérebro e medulas foram realizadas por coloração de Hematoxilina e Eosina. Os resultados apresentados indicam que a modificação estrutural da genisteína originou derivados não citotóxicos, com elevada capacidade de inibir a concentração de IL-12. Entretanto, estes derivados da genisteína não foram capazes de inibir TNF- $\alpha$ . A produção de NO foi significativamente inibida pelos derivados monoésteres (**2,3**) e monoéter (**6,7**) de maneira dose-dependente. Os dados obtidos *in vivo* indicam que o tratamento com o TDG melhora os sinais clínicos da EAE e isto pode ser correlacionado com uma redução na porcentagem de células produzindo IL-17 e um aumento de células Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> no cérebro. Além disso, o tratamento com o TDG aumentou a liberação de IL-10 e a expressão de CTLA-4 além de reduzir a liberação de IFN- $\gamma$  e IL-6. Desta forma, os dados sugerem um papel imunomodulatório do TDG na EAE e possivelmente na EM.

**Palavras-chave:** Esterificação. Eterificação. Genisteína. Citocina. Óxido Nítrico. EAE. Esclerose Múltipla. IL-17. Foxp3. IFN- $\gamma$ .



## ABSTRACT

Multiple Sclerosis (MS) is a severe and disabling chronic autoimmune inflammatory demyelinating disease of the central nervous system (CNS), that affect around one million people at entire world. Among the therapeutic agents currently approved for the treatment of MS can be cited the interferon beta (IFN- $\beta$ ) and the glatiramer acetate, however, these agents do not promote the cure or full recovery of patients in advanced stages. Several studies showed that hormones, such as estradiol and progesterone, could reduce the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). The isoflavones share many structural similarities with endogenous estrogens. Studies with genistein showed the beneficial effects of isoflavones in EAE. However, the chemical structure of genistein has characteristics that limit its clinical application, such as rapid excretion and decreased serum levels. This study aimed evaluate the effect of seven lipophilic derivatives of genistein in the modulation of *in vitro* response of murine J774A.1 macrophages activated with lipopolysaccharide and IFN- $\gamma$ , and verify the performance of one *in vitro* selected analogue on modulating *in vivo* the immune response in EAE. The lipophilic derivatives were evaluated in LPS+IFN- $\gamma$ -activated J774A.1 macrophage cultures to their effects on cytotoxicity and nitric oxide, IL-12 and TNF- $\alpha$  production. The effects of the selected genistein derivative **3** (7-O-genistein-tetradecanoil - TDG) on the development of EAE induced in C57BL/6 mice immunized with MOG<sub>35-55</sub> were performed. At 14<sup>th</sup> day after induction, mice were treated with TDG for seven days. At 21<sup>st</sup> day the percentage of mononuclear cells isolated from brains expressing CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CTLA-4<sup>+</sup> and Foxp3<sup>+</sup> and producing IL-17<sup>+</sup> and IL-10<sup>+</sup> were determined by flow cytometry. The concentration of IL-6, IFN- $\gamma$  and IL-10 in brain and spinal cord were determined by ELISA. Histological analysis of brain and spinal cord were performed by hematoxylin and eosin staining. The results showed that the modification of genistein enables the generation of non-cytotoxic compounds with increased IL-12 inhibition, despite of failed TNF- $\alpha$  inhibition. The NO production was inhibited by the monoester (**2,3**) and monoether (**6,7**) compounds in a dose-dependent manner. The *in vivo* data indicated that treatment with TDG improved the clinical signs of EAE which can be correlated with a reduction in the percentage of cells producing IL-17 and the increment of Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cell population at brain. Furthermore, treatment with TDG increased the release of IL-10 and expression of CTLA-4 and reduced the release of IFN- $\gamma$  and IL-6. Altogether, the data suggest an immunomodulatory role of the TDG in EAE and possibly MS.

**Keywords:** Esterification. Etherification. Genistein. Cytokines. Nitric Oxide. EAE. Multiple Sclerosis. IL-17. Foxp3. IFN- $\gamma$ .

## LISTAS DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Distribuição mundial da prevalência de EM segundo Organização Mundial de Saúde (OMS, 2008).	21
<b>Figura 2</b>	Padrões clínicos da Esclerose Múltipla (Adaptado: LUBLIN et al., 2007)	22
<b>Figura 3</b>	Estrutura molecular da genisteína e estradiol (Adaptado: Soucy et al., 2006)	32
<b>Figura 4</b>	Delineamento experimental	39
<b>Figura 5</b>	Preparação dos derivados da genisteína: Monoésteres (2,3), diésteres (4,5), monoéteres (6,7) e diéter (8). Reagentes e condições: a) diciclohexilcarbodiimida, dimetilaminopiridina, diclorometano. b) tert-butóxido do potássio, alquil iodeto.	40
<b>Figura 6</b>	Síntese do composto 9. Reagentes e condições: a) Ac <sub>2</sub> O, piridina, temperatura ambiente, 24h.	40
<b>Figura 7</b>	Processo de indução do modelo de encefalomielite autoimune experimental (EAE), período de avaliação do escore clínico.	44
<b>Figura 8</b>	Média do peso e escore clínico. (A) Peso dos camundongos (n=17 por grupo) imunizados ou não com peptídeo MOG <sub>35-55</sub> . (B) Escore clínico de camundongos (n=17 por grupo) imunizado com peptídeo MOG <sub>35-55</sub> . Os sinais clínicos foram registrados do dia 0 até o dia 21 após a imunização. Tratamento com TDG ou genisteína tiveram início no 14° dia após a imunização. CT= grupo não imunizado, NT-EAE= grupo imunizado não tratado, genisteína= grupo imunizado tratado com genisteína e TDG= grupo imunizado tratado com O-tetradecanoil-genisteína. Cada ponto representa a média±SEM. *p<0.01 de genisteína versus NT-EAE e TDG versus NT-EAE.	53
<b>Figura 9</b>	Porcentagem de células T IL-17 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> (A), Foxp3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> (B), CTLA-4 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> (C) e IL-10 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> (D) determinada por citometria de fluxo de células mononucleares isoladas do cérebro (n=8 animais por grupo) no 21° dia após a imunização com peptídeo MOG <sub>35-55</sub> . Tratamento com TDG ou genisteína tiveram início no 14° dia após a imunização. CT= grupo não imunizado, NT-EAE= grupo imunizado não tratado, genisteína= grupo imunizado tratado com genisteína e TDG= grupo imunizado tratado com O-tetradecanoil-genisteína. * = p < 0.05 versus genisteína. ** = p < 0.05 versus NT-EAE.	55
<b>Figura 10</b>	Concentração de IL-17 no homogenato de cérebro (A) e medula (C) (n=5 animais por grupo) medidas por ELISA no 21° dia após a imunização com peptídeo MOG <sub>35-55</sub> . Tratamento com TDG ou genisteína tiveram início no 14° dia após a imunização. CT= grupo não imunizado, NT-EAE= grupo imunizado não tratado, genisteína= grupo imunizado tratado com genisteína e TDG= grupo imunizado tratado com O-tetradecanoil-genisteína. * = p < 0.05 versus genisteína. ** = p < 0.05 versus NT-EAE	57
<b>Figura 11</b>	Concentração de IFN-γ em cérebro e medula. As concentração de IFN-γ foram medidas por ELISA no 21° dia após imunização com peptídeo MOG <sub>35-55</sub> em homogenato de cérebro (A) e medula (B). CT= grupo não imunizado, NT-EAE= grupo imunizado não tratado, genisteína= grupo imunizado tratado com genisteína e TDG= grupo imunizado tratado com O-tetradecanoil-genisteína. * = p < 0.05 versus genisteína. ** = p < 0.05 versus NT-EAE.	58

- Figura 12** Concentração de IL-6 (A,B) e TGF- $\beta$  (C,D) em homogenato de cérebro e medula. As concentrações de IL-6 e TGF- $\beta$  foram medidas por ELISA no 21° dia após imunização com peptídeo MOG<sub>35-55</sub>. CT= grupo não imunizado, NT-EAE= grupo imunizado não tratado, genisteína= grupo imunizado tratado com genisteína e TDG= grupo imunizado tratado com O-tetradecanoil-genisteína. \* = p < 0.05 versus genisteína. \*\* = p < 0.05 versus NT-EAE. 59
- Figura 13** Concentração de IL-10 no homogenato de medula (n=5 animais por grupo) medidas por ELISA no 21° dia após imunização com peptídeo MOG<sub>35-55</sub>. Tratamento com TDG ou genisteína tiveram início no 14° dia após a imunização. CT= grupo não imunizado, NT-EAE= grupo imunizado não tratado, genisteína= grupo imunizado tratado com genisteína e TDG= grupo imunizado tratado com O-tetradecanoil-genisteína. \* = p < 0.05 versus genisteína. \*\* = p < 0.05 versus NT-EAE. 60
- Figura 14** Concentração de CCL20 em cérebro e medula. A concentração de CCL20 foi medida por ELISA no 21° dia após imunização com peptídeo MOG<sub>35-55</sub> em homogenato de cérebro (A) e medula (B). CT= grupo não imunizado, NT-EAE= grupo imunizado não tratado, genisteína= grupo imunizado tratado com genisteína e TDG= grupo imunizado tratado com O-tetradecanoil-genisteína. \* = p < 0.05 versus genisteína \*\* = p < 0.05 versus NT-EAE. 62
- Figura 15** Cérebros de camundongos C57Bl/6 imunizados com peptídeo MOG<sub>35-55</sub>. As figuras são representativas da análise histológica de cada grupo experimental: CT= grupo não imunizado (A, B), NT-EAE= grupo imunizado não tratado (C, D), TDG= grupo imunizado tratado com O-tetradecanoil-genisteína tratado (E, F), genisteína= grupo imunizado tratado com genisteína (G, H), coradas com H&E e capturadas em uma magnificação de 20x (A, C, E e G) e 40x (B, D, F e H), escala de barra= 100  $\mu$ m. Nos cortes histológicos de cérebros dos C57Bl/6 pertencentes ao grupo NT-EAE (C,D) observa-se a presença de infiltrado celular inflamatório meningeal (setas) ausente no grupo CT (A, B) que apresenta uma histologia normal sem regiões inflamatórias. No tratamento com TDG (E, F) ou com genisteína (G, H) também não foi observado infiltrado celular inflamatório, a histologia do cérebro dos animais dos grupos tratados foi semelhante ao grupo CT (A, B). 64
- Figura 16** Medulas de camundongos C57Bl/6 imunizados com peptídeo MOG<sub>35-55</sub>. As figuras são representativas da análise histológica de cada grupo experimental: CT= grupo não imunizado (A, B), NT-EAE= grupo imunizado não tratado (C, D, E e F), TDG= grupo imunizado tratado com O-tetradecanoil-genisteína tratado (G, H, I e J), genisteína= grupo imunizado tratado com genisteína (K, L), coradas com H&E e capturadas em uma magnificação de 4x (A, C, E, G, I e K) e 40x (B, D, F, H, J e L), escala da barra= 50 $\mu$ M (4x) e 100 $\mu$ M (40x). Nos cortes histológicos da medula dos animais pertencentes ao grupo CT (A, B) foi observado um tecido normal sem infiltrado inflamatório, em contraste os cortes histológicos de medula dos camundongos do grupo NT-EAE (C, D, E e F) apresentaram infiltrados celulares inflamatórios (setas). No tratamento com TDG (G, H, I e J) ou com genisteína (K, L) também não foi observado infiltrado celular inflamatório, semelhante ao observado no grupo CT (A, B). 65

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Distribuição dos animais em grupos, tratamento, dosagem e via de administração dos compostos	43
<b>Tabela 2</b>	Escala neurológica clínica para avaliar a EAE	45
<b>Tabela 3</b>	Inibição da produção de NO, IL-12 e TNF- $\alpha$ por derivados lipofílicos da genisteína em macrófagos J774A.1 ativados com LPS e IFN- $\gamma$ .	51

## LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** Distribuição dos animais em grupos, tratamento, dosagem e via de administração dos compostos. 30

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ADP</b>	Adenosina trifosfato
<b>APCs</b>	Células apresentadoras de antígenos
<b>CCL</b>	“CC chemokine ligands”
<b>CCR</b>	“C-C <i>chemokine</i> receptor”
<b>CFA</b>	“Freund's Complete Adjuvant” - Adjuvante completo de freund
<b>CTLA-4</b>	“Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4” - Antígeno 4 associado à linfócito T citotóxico
<b>DCC</b>	Diciclohexilcarbodiimida
<b>DMAP</b>	Dimetilaminopiridina
<b>DMF</b>	Dimetilformamida
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>EAE</b>	Encefalomielite autoimune experimental
<b>EDSS</b>	Escala expandida do estado de incapacidade
<b>EM</b>	Esclerose múltipla
<b>ER</b>	Receptor para estradiol
<b>FDA</b>	“Food and Drug Administration”
<b>Foxp3</b>	Fator de transcrição <i>forkhead</i> box P3
<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina e eosina
<b>HBV</b>	Vírus da hepatite B
<b>i.p</b>	Intraperitoneal
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon gama
<b>IFN-<math>\beta</math></b>	Interferon beta
<b>IL</b>	Interleucina
<b>iNOS</b>	“Nitric oxide synthases inducible”
<b>LCR</b>	Líquido cefalorraquidiano
<b>L-NMMA</b>	<i>N</i> <sup>ω</sup> -monometil-L-arginina
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>MAPK p38</b>	“P38 mitogen-activated protein kinases” - Proteína quinase ativada por mitógeno p38
<b>MHC</b>	Complexo de histocompatibilidade principal
<b>MOG</b>	Glicoproteína associada ao oligodendrócito
<b>MTT</b>	Corante <i>thiazol blue tetrazolium bromido</i>
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Nuclear fator kappa B

<b>NK</b>	<i>Natural Killer</i>
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NOS</b>	“Nitric oxide synthases”
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PBM</b>	Proteína básica da mielina
<b>PBS</b>	Tampão salina fosfato
<b>PE</b>	Ficoeritrina
<b>PerCP</b>	Peridina-clorofilproteína
<b>PLP</b>	Proteína proteolípídica da mielina
<b>PP</b>	Primária-progressiva
<b>PR</b>	Progressiva-recorrente
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>ROR-<math>\gamma</math>t</b>	Receptores órfãos nucleares
<b>RR</b>	Remitente-recorrente
<b>s.c</b>	Subcutânea
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>SP</b>	Secundária-progressiva
<b>TDG</b>	7-O-tetradecanoil-genisteína
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	“Transforming growth factor- beta”
<b>TJ</b>	“Tight junction”
<b>Th1</b>	T <i>helper</i> 1 – T auxiliar 1
<b>Th17</b>	T <i>helper</i> 17 – T auxiliar 17
<b>Th2</b>	T <i>helper</i> 2 – T auxiliar 2
<b>Tregs</b>	Linfócitos T reguladores
<b>VCAM-1</b>	“Vascular cell adhesion molecule 1” - Molécula de adesão celular vascular-1
<b>VLA-4</b>	“Very Late Antigen-4” - Integrina alfa 4 beta 1

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	18
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	20
2.1	Esclerose Múltipla	20
2.2	Resposta Imune na Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE)	24
2.3	Tratamento da EM	29
2.4	Fitoestrógenos no tratamento da EM	31
2.5	Derivados lipofílicos da genisteína.	33
<b>3</b>	<b>OBJETIVO</b>	37
3.1	Objetivo geral	37
3.2	Objetivos específicos	37
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODO</b>	38
4.1	<b>Delineamento experimental</b>	38
4.2	<b>Obtenção dos derivados da genisteína</b>	39
4.3	<b>Avaliação do efeito dos análogos de genisteína em macrófagos J774 estimulados com LPS e IFN-<math>\gamma</math></b>	41
4.3.1	Linhagem celular e cultura	41
4.3.2	Avaliação da citotoxicidade da genisteína e derivados	41
4.3.3	Determinação da produção de NO	42
4.3.4	Dosagem de citocinas	42
4.4	<b>Avaliação do TDG no modelo de EAE</b>	43
4.4.1	Animais	43
4.4.2	Indução do modelo de EAE	43
4.4.3	Tratamento com genisteína e derivado 3 (7-O-tetradecanoil-genisteína-TDG)	46
4.4.4	Eutanásia e coleta de tecidos e órgãos dos animais	46
4.4.5	Isolamento e preparação de células mononucleares do cérebro	47
4.4.6	Avaliação de marcadores celulares e citocinas intracitoplasmáticas por citometria de fluxo	47
4.4.7	Dosagens das citocinas IL-17, IL-6, TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ e IL-10 e da quimiocina CCL20 por ELISA	48
4.4.8	Análise histológica do cérebro e medula	48



4.4.9	Análise estatística	49
5	<b>RESULTADOS</b>	50
5.1	Avaliação do efeito dos derivados da genisteína na viabilidade celular e produção de NO, IL-12 e TNF- $\alpha$ em linhagem de macrófago J774.A1 estimulados com LPS e IFN- $\gamma$	50
5.2	Avaliação do efeito do derivado TDG e da genisteína nos sinais clínicos dos animais com EAE	52
5.3	Tratamento com TDG reduz a porcentagem de células produtoras de IL-17, aumenta a porcentagem de células expressando Foxp3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> , CTLA-4 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> e células CD4 <sup>+</sup> produzindo IL-10 no cérebro	54
5.4	Tratamento com TDG reduz a concentração de IL-17, IFN- $\gamma$ e IL-6 em homogenato de cérebro e medula sem alterar as concentração de TGF- $\beta$ . A concentração de IL-10 no homogenato de medula aumenta no tratamento com TDG	56
5.5	Análise da quimiocina CCL20 no macerado de cérebro e medula dos camundongos C57Bl/6 tratados com TDG	61
5.6	O derivado TDG reduz o infiltrado celular no cérebro e medula de animais com EAE em relação ao grupo não tratado	63
6	<b>DISCUSSÃO</b>	66
7	<b>CONCLUSÃO</b>	72
	<b>REFERÊNCIAS</b>	73
	<b>ANEXO I Synthesis of lipophilic genistein derivatives and their regulation of IL-12 and TNF-<math>\alpha</math> in activated J774A.1 cells</b> (artigo submetido)	87
	<b>ANEXO II Immunomodulatory effects and improved prognosis of experimental autoimmune encephalomyelitis after O-tetradecanoyl-genistein treatment</b> (artigo submetido)	88

# 1 INTRODUÇÃO

A Esclerose Múltipla (EM) caracteriza-se por ser uma doença inflamatória crônica desmielinizante do Sistema Nervoso Central (SNC), de natureza autoimune, sendo na maioria dos casos grave e incapacitante, afetando cerca de um milhão de pessoas em todo o mundo.

As falhas observadas na terapêutica atual da EM têm sido relacionadas à incapacidade que os tratamentos atuais possuem em promover a cura ou recuperação dos pacientes que se encontram em fase avançada. As terapias disponíveis são baseadas no uso de imunomoduladores e imunossupressores, administrados de acordo com a fase e a progressão da doença. O tratamento é geralmente acompanhado de efeitos adversos como letargia, agravamento de depressão e leucopenia, além disso, a manutenção deste tratamento gratuito pelo Sistema Único de Saúde torna-se onerosa, principalmente em função da crescente demanda e seu alto custo.

O modelo animal de encefalomielite autoimune experimental (EAE) é utilizado para o estudo da EM, sendo importante para o esclarecimento dos fatores envolvidos na patogênese da doença e também para o desenvolvimento de novas terapêuticas para o tratamento da EAE e conseqüentemente da EM.

De Paula e colaboradores (2008) mostraram o potencial terapêutico da genisteína, um fitoestrógeno, no tratamento da EAE. Neste estudo foi demonstrado que a genisteína melhorou os sinais clínicos da EAE, pela redução de citocinas pró-inflamatórias no SNC, além de ter induzido a redução do rolamento e adesão de células na microcirculação do SNC. Estudos da farmacocinética demonstraram que a genisteína, assim como outras isoflavonas, possuem uma meia vida plasmática curta, muito provavelmente em função da rápida depuração sérica o que pode limitar seus benefícios terapêuticos *in vivo*. Além disso, a esterificação *in vivo* tem sido considerada uma reação importante para potencializar os efeitos antioxidantes dos fitoestrógenos.

Desta forma, este estudo tem o objetivo de avaliar o efeito na modulação da resposta imune de sete derivados lipofílicos da genisteína, incluindo ésteres e

ésteres, utilizando para o estudo *in vitro* o modelo de macrófagos J774A.1 ativados e avaliar o efeito *in vivo* de um entre os sete derivados no modelo de EAE.

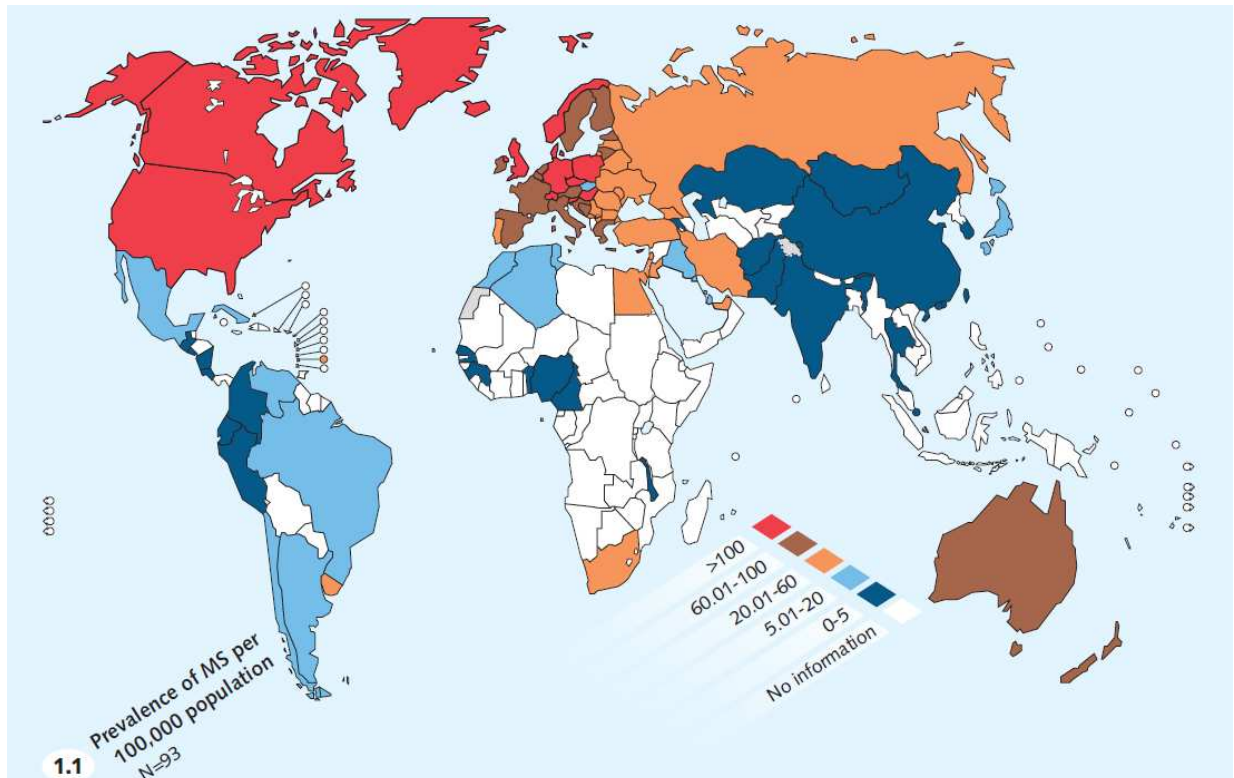
## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Esclerose Múltipla

A EM é uma desordem neurológica autoimune caracterizada por um processo inflamatório crônico desmielinizante do SNC, sendo na maioria dos casos grave e incapacitante, afetando cerca de um milhão de pessoas entre 17 e 65 anos, atingindo duas vezes mais mulheres que homens (SOSPEDRA e MARTIN, 2005; GOVERMAN, 2009). Algumas pessoas com EM não vivenciam completa incapacidade durante sua vida, entretanto, cerca de 60% dos indivíduos com EM tornam-se incapacitados em aproximadamente 20 anos após o início da doença, o que influencia diretamente na qualidade de vida do paciente e ocasiona um elevado custo financeiro para a sociedade.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) (2008) a estimativa mundial média da prevalência da EM é de 30 para cada 100.000 habitantes (Figura 1). A prevalência da EM é de 80 pessoas a cada 100.000 habitantes na Europa, 14.9 para o Mediterrâneo Oriental, 8.3 nas Américas, 5 no Pacífico Ocidental, 2.8 para o Sudeste da Ásia e 0.3 para a África.

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



**Figura 1** Distribuição mundial da prevalência de EM segundo Organização Mundial de Saúde (OMS, 2008).

De acordo com a OMS (2008) o número estimado de pessoas com EM é de aproximadamente 630.000 na Europa, 520.000 nas Américas, 66.000 no Mediterrâneo Oriental, 31.500 no sudeste da Ásia e 11.000 na África.

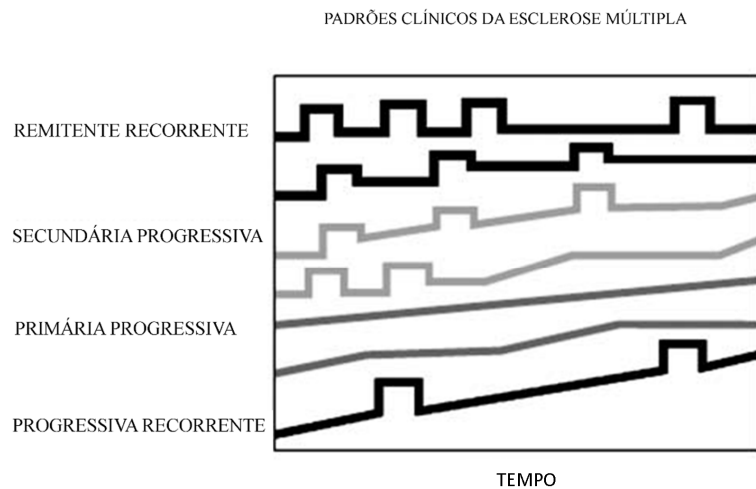
É importante ressaltar que existe a relação entre a distribuição geográfica, prevalência e incidência da EM, sendo constatado que o afastamento da região equatorial para ambos os hemisférios é acompanhado de um aumento no número de casos de EM (OMS, 2008).

A EM é uma desordem com extensiva variabilidade no sítio de ação e na apresentação clínica (taxas de acúmulo e disfunção), sendo caracterizada por episódios que envolvem lesão de medula, nervo óptico, tronco encefálico e cerebelo (LUBLIN et al., 2007).

As manifestações clínicas na EM incluem problemas sensoriais, motor e no sistema nervoso autônomo, sendo possível distinguir basicamente quatro formas clínicas da doença. No estágio inicial da doença 85% dos pacientes apresentam o tipo remitente-recorrente (RR), onde os surtos são de duração variável, seguidos de

um período de remissão e com recuperação total ou parcial do indivíduo afetado; a maioria dos pacientes do tipo RR evolui para a forma secundária-progressiva (SP), onde após a remissão dos surtos, apresentam leve progressão da doença. Aproximadamente 10% dos pacientes apresentam a EM primária-progressiva (PP) que inicia de forma progressiva, com platôs ocasionais e com pequenas melhoras temporárias. Na apresentação progressiva-recorrente (PR) desde o início observa-se o agravamento da incapacidade com surtos claramente identificáveis com ou sem recuperação do paciente (SOSPEDRA e MARTIN, 2005; LUBLIN et al., 2007; GOVERMAN, 2009).

Lublin e colaboradores (2007) apresentam as quatro formas clínicas da EM no gráfico obtido pela medida de escore segundo a Escala Expandida do Estado de Incapacidade (EDSS), demonstrando as consequências na progressão da doença após os surtos, caracterizando as formas clínicas da doença, onde a inclinação do gráfico para direita indica a piora do escore (Figura 2).



**Figura 2** Padrões clínicos da Esclerose Múltipla (Adaptado: LUBLIN et al., 2007).

A forma mais comum da EM é a RR que pode evoluir para a forma SP em função da contínua incapacidade. De acordo com Lublin e colaboradores (2007) o elevado número de recaídas no primeiro ano da doença está associado a um prognóstico ruim da doença. As variadas formas clínicas observadas no curso da EM

podem ser explicadas pela desmielinização, graus de inflamação, remielinização e neurodegeneração (PETERSON, ROBERT e FUJINAMI, 2007).

Na EM é observado a presença de infiltrados inflamatórios que estão associados à degradação da mielina presente nos oligodendrócitos e nos axônios, o que interfere diretamente na condução nervosa (BASSO et al., 2008). Os fatores que promovem a ativação periférica de células T virgens contra proteínas da mielina, com consequente formação do infiltrado inflamatório na EM, são ainda desconhecidos, mas parece ser resultado de uma combinação de fatores ambientais e genéticos que desencadeiam uma resposta autoimune que tem como principal alvo a bainha de mielina que reveste o axônio dos neurônios (WUCHERPFENING e STROMINGER, 1995; BASSO et al., 2008).

Os fatores ambientais estão principalmente relacionados às infecções virais e bacterianas, onde a semelhança estrutural entre a mielina e proteínas associadas a patógenos desencadeariam a reação inflamatória no SNC (FUJINAMI e OLDSTONE, 1985; WUCHERPFENING e STROMINGER, 1995). Fujinami e colaboradores (1985) verificaram semelhança estrutural entre o peptídeo do vírus da hepatite B (HBV) com a proteína básica de mielina (PBM) e concluíram que a infecção por HBV associada a outros fatores, poderia desencadear a EM por ativação de células T que respondem ao peptídeo do HBV e também à PBM. Outros patógenos como enterobactérias também são associadas com a patogênese da EM (LANG et al., 2002). Desta forma, acredita-se que as infecções associadas à predisposição genética, seriam responsáveis pelo desencadeamento da doença. Segundo Oksenberg e colaboradores (2008) os estudos com relação aos fatores genéticos envolvidos na EM estão evoluindo, sendo que atualmente já são conhecidos 18 alelos associados ao risco de desenvolvimento de EM.

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

A linhagem C57Bl/6 é amplamente utilizada na indução de EAE crônica grave e sem recaídas, especialmente quando se utiliza a glicoproteína associada ao oligodendrócito (MOG) como indutora da doença. O MOG tem sido utilizado com

base em estudos que apoiam a possibilidade dele ser o antígeno-alvo primário no desenvolvimento da EM, mesmo sendo este muito menos abundante que a PBM (ADELMANN et al., 1995; SOSPEDRA e MARTIN, 2005). Desta forma, o modelo de EAE é extremamente útil para a avaliação dos mecanismos imunológicos envolvidos na EM, assim como, no desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento desta patologia (ADELMANN et al., 1995; SOSPEDRA e MARTIN, 2005).

## **2.2 A Resposta Imune na Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE)**

Para iniciar um processo inflamatório no SNC, as células T específicas contra a mielina devem ser ativadas na periferia, posteriormente ter acesso ao SNC e em seguida serem reativadas por células apresentadoras de antígenos (APCs) responsáveis pela apresentação dos auto-antígenos (FLÜGEL et al., 2001; KAWAKAMI et al., 2004). A reativação de células T específicas contra a mielina desencadeia a produção de mediadores solúveis pelas células T e células residentes no SNC que recrutam mais células inflamatórias (FLÜGEL et al., 2001; MURPHY et al., 2010).

Nos modelos de indução da EAE utilizam-se proteínas da mielina, tais como, PBM, MOG, proteína proteolípídica da mielina (PLP) para desencadear a ativação de célula T reativas contra a mielina (LININGTON et al., 1993; KAWAKAMI et al., 2004). Para a indução do modelo de EAE, além da proteína proveniente da mielina é administrado também o adjuvante completo de freund (CFA), *toxina pertussis* e *Mycobacterium tuberculosis* que irão potencializar a apresentação da mielina e consequentemente promover a ativação de linfócitos T específicos (SHIVE et al., 2000; HOU et al., 2003).

Na EAE ou na EM as células T que foram ativadas na periferia contra proteínas da mielina devem seguir para o SNC, local que apresenta alta concentração destas proteínas (FLÜGEL et al., 2001). A entrada das células T autoreativas no SNC é um processo complexo, uma vez que este sítio anatômico é extremamente protegido pela barreira hematoencefálica, líquido cefalorraquidiano e as meninges (KIVISAKK et al., 2008).



Em condições normais o endotélio do parênquima cerebral não expressa as moléculas de adesão necessárias para a entrada de células T, entretanto, estas proteínas passam a ser expressas pelas células endoteliais do cérebro quando existe um processo inflamatório instalado, o que reduz a possibilidade do parênquima cerebral ser o local de entrada das células T na fase inicial da EAE (KIVISAKK et al., 2008).

Kivisakk e colaboradores (2008) apresentaram em seus estudos a importância do espaço subaracnóide no desenvolvimento da EAE, onde proteínas que influenciam a entrada de células T no SNC são constitutivamente expressas. O espaço subaracnóide está localizado entre as leptomeninges (aracnóide e pia-máter) e contém o líquido cefalorraquidiano (LCR) que circunda o cérebro e a medula espinhal. Estes autores sugerem que neste local as células T autoreativas que conseguem ultrapassar a barreira sangue LCR atravessando o endotélio das vênulas meníngeas ou do plexo coróide, serão reativadas por macrófagos e células dendríticas e conseqüentemente, poderão instalar o processo inflamatório inicial que irá se estender para o parênquima cerebral (KIVISAKK et al., 2008).

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

Trabalhos recentes têm mostrado que linfócitos T *helper* 17 (Th17), produtores de IL-17, estariam diretamente relacionados com o desenvolvimento da EAE (LAURENCE e O' SHEA, 2007; MURPHY et al., 2010; KANG et al., 2010;). Segundo Huppert e colaboradores (2010) a IL-17 produzida por linfócitos Th17 poderia contribuir para o rompimento da barreira hematoencefálica através da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) que influenciam no desempenho das *tight*

*junction* (TJ) responsáveis pela forte adesão entre as células endoteliais. A polarização de linfócitos Th17 ocorre na presença de IL-23, IL-6 e do fator transformador do crescimento-beta (TGF- $\beta$ ). Em protocolos experimentais utilizando camundongos geneticamente deficientes em IL-6 e IL-23 não foi possível induzir a EAE, indicando a importância destas citocinas no desenvolvimento da patologia e consequentemente dos linfócitos Th17 (ZELANTE et al., 2007; KROENKE, 2008; QUINTANA e WEINER, 2009; MIOSSEC, 2009).

A IL-17 é caracterizada como uma molécula pró-inflamatória que estimula células epiteliais, endoteliais e fibroblastos a produzirem outras citocinas e quimiocinas como, por exemplo, IL-6, proteínas inflamatórias de macrófagos, fatores estimulatórios de granulócitos e proteínas quimioatraentes de monócitos (PARK et al., 2005). A migração inicial de células Th17 para o cérebro parece estar relacionada com o receptor de quimiocina (CCR) 6, constitutivamente expresso por células Th17, que encontra o seu ligante de quimiocina (CCL) 20 em células epiteliais do plexo coróide, esta interação parece ser importante para promover a entrada dos linfócitos Th17 no SNC (REBOLDI, 2009). No entanto, alguns estudos mostram que o perfil celular Th1 ou Th17 na EAE estaria influenciando no local de infiltração, de forma que o predomínio de células Th1 promoveria infiltração significativa na medula, mas não no cérebro como anteriormente citado, enquanto que uma EAE cujo perfil celular fosse Th17 o infiltrado seria predominante no cérebro (LEES et al., 2008).

Atualmente questiona-se também um possível papel protetor do IFN- $\gamma$  pela relação no balanço Th1 e Th17. O papel do IFN- $\gamma$  no desenvolvimento da EAE é questionado no estudo de Berghmans e colaboradores (2011), que induziram EAE em camundongos Biozzi ABH e IFN- $\gamma$  *knockout* através da administração de homogenato de medula espinhal provenientes de camundongo SJL/J. Os autores mostraram que a EAE torna-se mais grave quando induzida na ausência de IFN- $\gamma$  e isto estaria associado ao aumento de células Th17 produtoras de IL-17. Berghmans e colaboradores (2011) também apresentaram em seus estudos que ao neutralizarem o IFN- $\gamma$  através da injeção de anti-IFN- $\gamma$  os animais induzidos progrediam para uma EAE mais grave, porém a administração de IFN- $\gamma$  exógeno

promovia a redução no número de células produtoras de IL-17 no baço, linfonodo e SNC dos animais tratados com consequente melhora dos sinais clínicos.

Murphy e colaboradores (2010), em estudo realizado com camundongos C57Bl/6 induzidos com EAE pela injeção de MOG<sub>35-55</sub>, observaram que o infiltrado de Th17 precede o início dos sinais clínicos da EAE, sendo acompanhado de um aumento de IL-1 $\beta$  e IL-6. A ativação da micróglia e o infiltrado de macrófagos ocorreriam no início dos sinais clínicos da EAE, enquanto que o infiltrado do subtipo celular Th1 seria verificado no cérebro em uma etapa mais tardia da doença.

Kroenke e colaboradores (2008) utilizaram linfócitos isolados de SJL/J induzidos com PLP<sub>139-151</sub> primados *in vitro* para o perfil Th1 ou Th17 para induzir EAE e estudar as diferenças entre a doença promovida por ambos os subtipos celulares. Em seus estudos os autores demonstraram que a transferência adotiva de células polarizadas Th1 ou Th17 não promoviam diferenças nos escores clínicos, entretanto, as análises dos tecidos revelaram diferenças importantes como um infiltrado rico em macrófagos e proeminente produção de NOS 2 em EAE induzida por Th1 e um infiltrado caracterizado por neutrófilos na EAE induzida pelo perfil Th17.

Hofstetter e colaboradores (2005) ao tratarem camundongos C57Bl/6 com EAE induzida por MOG<sub>35-55</sub> com anticorpo neutralizante de IL-17 demonstraram uma melhora nos sinais clínicos dos animais com EAE tratados com o anticorpo neutralizante de IL-17 em relação aos camundongos com EAE que não receberam o tratamento.

Levando em consideração os estudos acima apresentados, é possível verificar que estes ainda não são conclusivos em relação ao papel desempenhado por cada subtipo celular Th1, Th17 e das citocinas relacionadas na patogênese da EAE. Em função das variações nos modelos e dos resultados obtidos nos estudos experimentais, ainda não é possível delegar de forma inquestionável maior responsabilidade pelo desencadeamento da EAE para Th1 ou Th17.

Enquanto Th1 e Th17 estão envolvidas na patogênese da EAE, os linfócitos T reguladores (Tregs) são considerados importantes na melhora dos sinais clínicos observados na EAE (PETRO et al., 2011; ZHANG et al., 2011). As Tregs são caracterizadas pelo fator de transcrição *forkhead* box P3 (Foxp3) e são células importantes na manutenção da tolerância imunológica e consequentemente no

controle de doenças autoimunes (CHEM et al., 2003; KOHM et al., 2002). O TGF- $\beta$  é uma citocina fundamental na polarização de Tregs, sendo que sua presença na ausência de IL-6 favorece a polarização das Tregs em detrimento de Th17 (BETELLI et al., 2006; CHEM et al., 2003). A ação das Tregs parece ser principalmente através da produção de IL-10 que atua inibindo a função das APCs, e conseqüentemente inibindo a ativação de células T (CUA et al., 1999; SPACH et al., 2006).

Pesquisas que abordam novos tratamentos demonstram que o aumento de célula Tregs pode ser o responsável pela melhora do escore clínico de animais induzidos com EAE. Zhang e colaboradores (2011) estudaram a ação do  $\beta$ -elemeno em camundongos C57BL/6 induzidos com EAE por meio da injeção de 200 $\mu$ g de MOG<sub>35-55</sub>, emulsificado com CFA, suplementado com 4 mg/mL de *Mycobacterium tuberculosis*, além da injeção intraperitoneal (i.p) com 400 ng de *toxina pertussis* no dia da indução e 48 horas após a indução. Os resultados obtidos por Zhang e colaboradores (2011) demonstram um atraso no início dos sinais clínicos da EAE nos animais induzidos e tratados com  $\beta$ -elemeno em relação aos animais não tratados. Este atraso dos sinais clínicos da EAE foi atribuído ao efeito imunomodulador do  $\beta$ -elemeno ao reduzir a expressão de células Th17 e promover a expansão de células Tregs, através da redução de RNA mensageiro para IL-17, IL-6, IL-23 e ROR $\gamma$ t

Petro (2011) ao estudar o efeito do resveratrol em camundongos SJL/J induzidos com EAE pela injeção de PLP<sub>139-151</sub>, concluiu que o efeito deste polifenol em melhorar os sinais clínicos da EAE está relacionado ao aumento de células Tregs e conseqüentemente, ao aumento de IL-10 no SNC.

O acetato de glatirâmer é uma droga liberada para o tratamento da EM, sendo seu efeito atribuído à atividade imunomoduladora através do bloqueio do MHC atuando como um antagonista de células T e ao aumento da produção de mediadores anti-inflamatórios (FRIDKIS-HARELI et al., 1994; AHARONI et al., 1999; FARINA et al., 2005, WEBER et al., 2007). Aharoni e colaboradores (2010) avaliaram o efeito do acetato de glatirâmer em dois modelos de EAE, um utilizando camundongos F1 (SJL/J x Balb/c) induzidos com PLP<sub>139-151</sub> e o outro utilizando camundongos C57BL/6 induzidos com MOG<sub>35-55</sub>, em ambos os modelos as proteínas da mielina foram emulsificadas com CFA enriquecido com 3mg/mL de *Mycobacterium tuberculosis*, além da injeção de *toxina pertussis* no dia e 48 horas

após a indução. Os autores observaram que em camundongos tratados com acetato de glatirâmer, mesmo quando o tratamento foi iniciado após a exacerbação da doença, tiveram uma redução do infiltrado de células Th17 acompanhado de um aumento de células Tregs no SNC com consequente melhora dos sinais clínicos em ambos os modelos de EAE.

Alguns trabalhos com o intuito de esclarecer os mecanismos relacionados à função supressora das células Tregs foram realizados. Wing e colaboradores (2008) abordaram a importância do antígeno 4 associado a função de linfócito (CTLA-4) no desempenho das células Tregs. Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que a expressão de CTLA-4 é crítica para a atividade supressora das células Tregs, uma vez que o CTLA-4 afeta a função das APCs, já que ao se ligar no CD80 e CD 86 presentes nas células dendríticas promove consequentemente a redução da ativação de linfócitos T.

A importância do CTLA-4 na expansão de células T encefalitogênicas na EAE já havia sido relatada por Hurwitz e colaboradores (2002) ao realizarem um trabalho utilizando-se bloqueador de CTLA-4. Neste estudo foi demonstrado que o bloqueio de CTLA-4 aumenta a frequência de células T antígeno específica auto-reativa na periferia, sugerindo, portanto, que a expansão de células T encefalitogênicas no modelo de EAE seria limitada pela expressão de CTLA-4, que atuaria na manutenção da tolerância periférica à antígenos próprios.

### **2.3 Tratamento da EM**

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

Na Quadro 1 estão resumidos os principais agentes terapêuticos utilizados no tratamento da esclerose múltipla, assim como seus possíveis efeitos (SORENSEN et al., 1999; NEUHAUS et al., 2006, JONES e COLES, 2010).

**Quadro 1** Distribuição dos animais em grupos, tratamento, dosagem e via de administração dos compostos.

FÁRMACO	MECANISMO DE AÇÃO	REFERÊNCIA
IFN- $\beta$	Atua inibindo a migração de células dendríticas para o linfonodo e sítio inflamatório; Alteração entre o balanço de Th1 e Th2; Inibir a diferenciação de Th2; Mecanismo não esclarecido totalmente;	SORENSEN et al., 1999 AXTELL et al., 2010 YEN et al., 2010 GUO et al., 2008 MARKAR et al., 2008 MARTIN-SAAVEDRA et al., 2008
Acetato de Glatirâmer	Atua aumentando Th2; Estimula a produção de IL-10; Produz baixa quantidade de citocina pró-inflamatória; Aumenta a produção do antagonista de IL-1 $\beta$ (sIL-1Ra);	NEUHAUS et al., 2001 KIM et al., 2004 BURGER et al., 2009
Natalizumab	Atua inibindo a entrada de linfócitos no SNC por se ligar a molécula VLA-4e impedir a interação desta com a VCAM-1 presente no endotélio;	ELICES et al., 1990
Fingolimod	Impede a migração de células para os órgão linfoides secundários;	SAWICKA et al., 2005
Daclizumab	Inibe a expansão e sobrevivência de células T ao bloquear o receptor de IL-2;	BIELEKOVA et al., 2006
Rituximab	Promove a depleção de células B;	BAR-OR et al., 2008
Alemtuzumab	Bloqueador do CD52; Provoca linfopenia;	COLES et al., 2006
Cladribine	Análogo do ATP; Incorpora ao DNA; Resulta em dano e morte celular;	BEUTLER et al., 1996

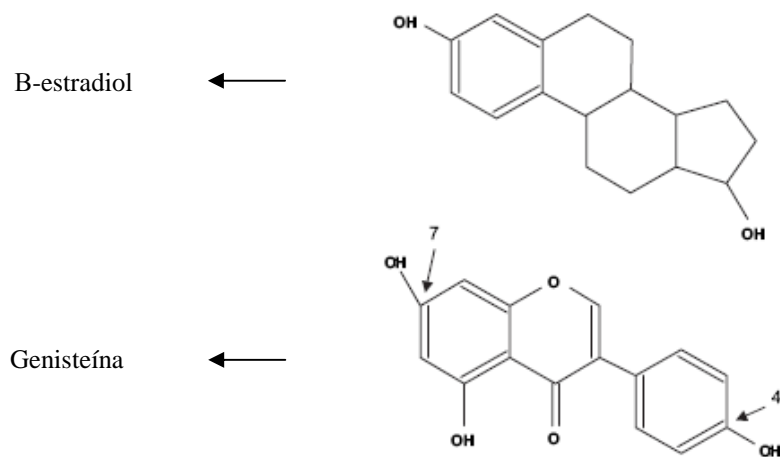
Embora todos estes fármacos apresentem resultados promissores no tratamento da EM, eles não promovem a cura do paciente em fase evolutiva da doença. Além disso, estes fármacos apresentam um problema fundamental que é sua atuação não seletiva nas células do sistema imune, o que desencadeia efeitos colaterais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

## 2.4 Fitoestrógenos no tratamento de EM

A soja representa hoje uma das principais fontes de pesquisas quando se trata do estudo de terapias alternativas, em função dos seus efeitos biológicos sobre doenças de caráter inflamatório não infeccioso como osteoporose, doenças cardiovasculares, câncer de mama e próstata (GOTOH et al., 1998; POLKOWSKI et al., 2004). A ação marcante antioxidativa, antiproliferativa celular e estrogênica da soja têm sido atribuída a alguns dos seus componentes, especialmente os fitoestrógenos (YAMAKOSHI et al., 2000; SONG, YAN e CAI, 2006).

Os fitoestrógenos são compostos vegetais com propriedades estrogênicas, sendo os isoflavonóides os representantes mais comuns deste grupo. Atribuí-se as propriedades estrogênicas dos fitoestrógenos à sua similaridade estrutural com estrógenos endógenos (Figura 3).

Entre os isoflavonóides destacam-se a genisteína e a daidzeína, que são encontradas em uma variedade de plantas incluindo frutas e vegetais, mas são especialmente abundantes na soja (THAM et al., 1998). A utilização destes compostos vegetais na prevenção de doenças relacionadas aos hormônios sexuais tais como, amenorréia, osteoporose, câncer de mama, depressão e irritabilidade, pode, portanto, representar uma importante terapia alternativa (MOLL, 2002; MONTENEGRO et al., 2009). Diversos estudos demonstram a propriedade que os hormônios sexuais (estradiol, progesterona) possuem de diminuir a gravidade da EAE por mecanismos ainda não esclarecidos (EVRON et al., 1984; BEBO et al., 2001; ELLOSO et al., 2005; GARAY et al., 2008; GARAY et al., 2009; GIRAU et al., 2010).



**Figura 3** Estrutura molecular da genisteína e estradiol. (Adaptado: Soucy et al., 2006)

Os níveis estrogênicos são associados a uma susceptibilidade maior das mulheres no desenvolvimento da EM quando comparadas aos homens. Entretanto, a elevação do estrogênio durante a gravidez exerce um papel protetor em relação à EM. Os dois efeitos aparentemente contraditórios do estrogênio na EM, motivaram Garay e colaboradores (2008) a avaliarem os efeitos do estradiol no tratamento de camundongos C57Bl/6 induzidos com EAE por injeção do peptídeo MOG<sub>40-45</sub>. Neste estudo foi observado que o estradiol é eficaz na proteção contra o desenvolvimento da EAE, mesmo em doses inferiores às alcançadas durante a gravidez.

Garay e colaboradores (2009) trataram com progesterona camundongos C57Bl/6 com EAE. Para a indução da EAE foram utilizados 200 µg do peptídeo MOG<sub>40-54</sub>, emulsificado com CFA contendo 0,6 mg de *Mycobacterium tuberculosis*, estes animais receberam também 400 ng de toxina pertussis no dia da indução e após 48 horas. Cada animal recebeu, uma semana antes da indução, o implante de um *pellet* contendo 100 mg de progesterona. Os resultados obtidos demonstram que a progesterona exerce um efeito neuroprotetor, reduzindo o dano no axônio dos animais induzidos e tratados com progesterona em relação ao grupo induzido não tratado.

Kuiper e colaboradores (1998) avaliaram a interação entre fitoestrógenos e receptores para estradiol (ER) dos tipos alfa (ER $\alpha$ ) e beta (ER $\beta$ ) *in vitro*, os



fitoestrógenos estudados apresentaram alta afinidade para ambos os receptores estrogênicos. Entretanto, a genisteína liga-se mais fortemente à receptores ER $\beta$ .

Os benefícios potenciais dos fitoestrógenos também podem ser atribuídos as propriedades metabólicas que não envolvem os receptores de estrogênio, tais como, no aumento da atividade de enzimas antioxidantes, decréscimo de mediadores pró-inflamatórios por meio da inibição da via do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) e da proteína quinase ativada por mitógeno p38 (MAPK p38) (COMALADA et al., 2006; DIJSSELBLOEM et al., 2007).

## **2.5 Derivados lipofílicos da genisteína**

A genisteína apresenta alguns benefícios já comprovados, Akiyama e colaboradores (1987) demonstraram que esta substância possui a capacidade de inibir a atividade da proteína quinase tirosina específica que está associada a gene geradores de câncer provenientes de retrovírus.

A genisteína é também considerada um inibidor do NF- $\kappa$ B que transcreve genes específicos para a sobrevivência de células, invasão e metástase de células oncogênicas de pulmão (GADGEEL et al., 2009). Os resultados apresentados por este estudo demonstram que o tratamento da cultura de linhagens celulares provenientes de câncer de pulmão com genisteína, resulta na inibição do NF- $\kappa$ B e aumento da atividade dos fatores de crescimento epidérmico que estão relacionados à atividade antitumoral.

A avaliação da modulação de produção de óxido nítrico (NO) por 36 flavonóides de ocorrência natural, incluindo a genisteína, em macrófagos J774.A1 estimulados com lipopolissacarídeo (LPS), demonstrou que a genisteína, entre outros flavonoides testados, possui a capacidade de inibir a proteína óxido nítrico sintase induzível (iNOS), inibindo a produção de NO e a ativação do NF- $\kappa$ B, um importante fator de transcrição para a iNOS (HÄMÄLÄINEN et al., 2007).

Estudo recente realizado por Donzelli e colaboradores (2010) avaliou o efeito neuroprotetor da genisteína no modelo de isquemia cerebral em cobaias. Os

resultados demonstram uma redução dos danos neurais no grupo tratado com genisteína em comparação ao grupo não tratado. Para a avaliação destes danos neurais foram analisados aspectos comportamentais e eletroencefalografia, para a exploração de certas estruturas cerebrais. Os resultados obtidos mostram que a genisteína exerce uma função neuroprotetora por meio da ativação de ER $\beta$  nos cobaias.

De Paula e colaboradores (2008), utilizando a genisteína no tratamento da EAE obtiveram uma redução dos sinais clínicos nos animais induzidos com EAE e tratados com 200mg/Kg de genisteína via s.c. A indução do modelo foi feita com a injeção de peptídeo MOG<sub>35-55</sub> previamente emulsificado com CFA, suplementado com 400 $\mu$ g de *Mycobacterium tuberculosis*, além da injeção de toxina pertussis (300 ng por animal) no dia e 48 horas após a indução. Neste estudo a redução dos sinais clínicos foi associada a um declínio de citocinas pró-inflamatórias IFN- $\gamma$ , IL-12, TNF- $\alpha$  e aumento da citocina anti-inflamatória IL-10 no SNC, além da diminuição do rolamento e adesão de células para dentro do SNC.

A genisteína, nos alimentos não fermentados ricos em isoflavonóides, é encontrada na sua forma de glicosídeos. Os glicosídeos de genisteína são fracamente absorvidos no intestino humano em função do seu caráter hidrofílico (SETCHELL et al., 2002). A hidrólise da genisteína  $\beta$  glicosídeo separa a genisteína do glicosídeo, dando origem a forma denominada aglicona (genisteína livre) que é então absorvida no intestino. Desta forma, a lipofilicidade é considerada uma característica química importante no processo de absorção intestinal. Um estudo que avaliou a atividade biológica de glicosídeos lipofílicos e hidrofílicos de genisteína apresentou que os glicosídeos lipofílicos são significativamente mais ativos em comparação aos glicosídeos hidrofílicos (POLKOWSKI et al., 2004).

Nos alimentos fermentados, rico em genisteína, existe uma concentração mais elevada de genisteína aglicona, pois os microrganismos presentes no processo de fermentação clivam a genisteína  $\beta$  glicosídeo aumentando a concentração de genisteína livre (SETCHELL et al., 1998).

Já foi demonstrado em estudos de farmacocinética que a genisteína sofre circulação enterohepática que metaboliza a genisteína à conjugados, principalmente genisteína glucoronídeo e genisteína sulfato, que chegam a representar 97% da

genisteína circulante (SHELNUTT et al., 2002). Estudos estão sendo promovidos para verificar a atividade biológica destes metabólitos da genisteína (SHELNUTT et al., 2002; CHEN et al., 2003).

Estudos abordam a hipótese que a genisteína pode sofrer esterificação *in vivo* assim como ocorre com os estrógenos endógenos humanos. A esterificação de estrógenos endógenos humanos favorece a sua atuação em receptores estrogênicos e sua atividade antioxidante, de forma que a genisteína, da mesma forma que os estrógenos endógenos humanos, podem sofrer esta esterificação *in vivo*, fato que potencializaria sua atividade antioxidante (MENG et al., 1999; LEWIS et al., 2000).

Meng e colaboradores (1999) ao avaliarem a atividade antioxidante de isoflavonóides em lipoproteínas de baixa densidade, verificaram que alguns entre os ésteres de genisteína sintetizados apresentaram uma atividade antioxidante mais elevada do que a genisteína na sua forma de aglicona.

Badeau e colaboradores (2005) avaliaram a concentração do éster de genisteína (4' 7-O-dioleato-genisteína) após a administração em macacos. Os resultados mostram que a concentração plasmática do éster de genisteína em alguns animais foi mais elevada do que a forma aglicona da genisteína. Entretanto, a atividade antioxidante deste éster não foi abordada neste estudo.

Para a realização do presente trabalho, sete derivados lipofílicos da genisteína (Sigma, St. Louis, MO, USA) foram sintetizados no Departamento de Química, no Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Juiz de Fora, visando obter um aumento da característica lipofílica e melhor difusão da substância pela membrana plasmática das células do organismo, em especial, linfócitos T e macrófagos, além de promover a circulação da genisteína esterificada que poderia apresentar uma atividade biológica mais elevada.

A baixa disponibilidade de agentes terapêuticos eficientes no tratamento da EM e os efeitos colaterais proeminentes geralmente observados nas terapias convencionais são fatores que impulsionam as pesquisas por novas terapias para o tratamento da EM.

A genisteína é uma substância natural, os estudos realizados para investigação de suas propriedades terapêuticas relatam que esta substância é capaz de apresentar atividades biológicas relacionadas ou não aos receptores

estrogênicos, sendo benéfica em doença hormônio relacionada e que possuem poucos efeitos colaterais. Estudo realizado por De Paula e colaboradores (2008) demonstraram a capacidade da genisteína de reduzir os sinais clínicos da EAE.

No presente trabalho realizamos a investigação da propriedade imunomodulatória *in vitro* de substâncias derivadas de modificações estruturais na genisteína, com o objetivo de obter um composto com capacidade biológica ainda mais eficiente que a atividade apresentada pela genisteína. Através da investigação *in vitro* um composto derivado da genisteína foi selecionado para a aplicação *in vivo* no modelo de EAE. Os efeitos deste análogo no sistema imune foram investigado por análise do perfil das principais células e citocinas envolvidas no desenvolvimento da EAE. Desta forma, espera-se com este estudo contribuir na investigação de novos agentes terapêuticos que poderão ser utilizados no tratamento da EM e que estes alcancem melhores resultados do que as terapias atuais.

## 3 OBJETIVO

### 3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito de sete derivados lipofílicos da genisteína na modulação da resposta *in vitro* de macrófagos murinos J774.A1, e verificar a atuação de um entre os derivados avaliados *in vitro* na modulação da resposta imune *in vitro* no modelo de EAE.

### 3.2 Objetivos específicos

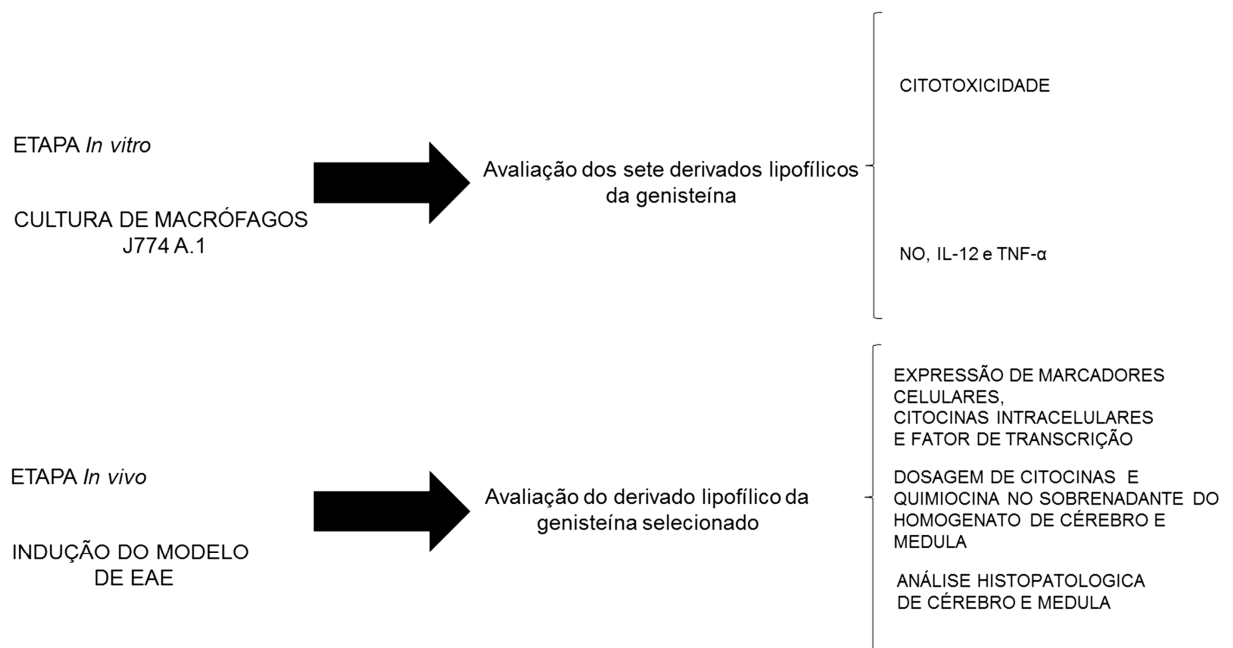
- Analisar o efeito do tratamento com os derivados lipofílicos da genisteína **2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8** na viabilidade de macrófagos J774. A1;
- Quantificar a produção de NO, IL-12 e TNF- $\alpha$  em sobrenadantes de cultura de macrófagos J774.A1 estimulados com IFN- $\gamma$  e LPS e tratados com os derivados lipofílicos da genisteína **2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8**.
- Selecionar um derivado para utilização no modelo de EAE.
- Avaliar o efeito do derivado lipofílico da genisteína **7-O-tetradecanoil-genisteína** (TDG), selecionado na etapa *in vitro*, na modulação da resposta imune nos animais com EAE, através dos seguintes parâmetros:
  - (i) expressão de marcadores celulares (CTLA-4, CD4 e CD3), citocinas intracelulares (IL-17 e IL-10) e o fator de transcrição (Foxp3) em células mononucleares isoladas do cérebro, através de citometria de fluxo;
  - (ii) produção das citocinas IL-17; IL-6, TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$  e IL-10 e quimiocina CCL20 em sobrenadante de macerados de cérebro e medula espinhal através de ELISA;
  - (iii) análise do infiltrado celular de cérebro e medula;

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Delineamento experimental

Inicialmente foi realizada uma avaliação *in vitro* do efeito dos derivados da genisteína, utilizando-se a linhagem de macrófagos murinos J774.A1 estimulados com LPS e IFN- $\gamma$ . Os macrófagos J774.A1 foram cultivados na presença dos derivados 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 para avaliação da citotoxicidade, dosagem de NO e dosagens de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-12. O derivado 3 (7-O-tetradecanoil-genisteína) referido neste estudo como TDG foi selecionado para os estudos *in vivo*, em função dos resultados interessantes obtidos na etapa *in vitro*, principalmente pela manutenção da capacidade de inibir os mediadores inflamatórios na menor concentração testada (52  $\mu$ M), por suas características físico-químicas como o grau de solubilidade do composto. Na segunda etapa do estudo o modelo de EAE foi induzido e os animais foram tratados com TDG ou com genisteína utilizada neste estudo como um composto de referência em função dos estudos prévios que demonstraram sua capacidade em melhorar os sinais clínicos da EAE através da modulação da produção de citocinas (DE PAULA et al., 2008).

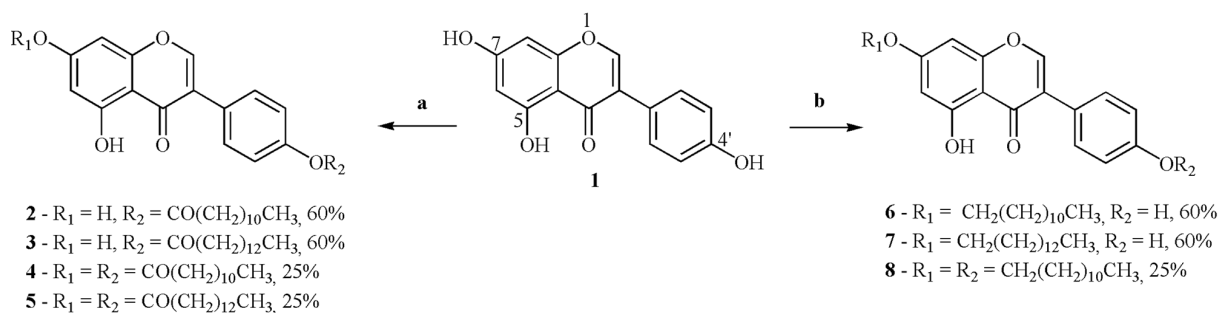
Os animais com EAE induzidos não tratados (grupo NT-EAE), induzidos tratados com TDG (grupo TDG), induzidos tratados com genisteína (grupo genisteína) ou não induzidos e não tratados (grupo CT) foram avaliados por meio dos seguintes parâmetros: escore clínico, produção das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-17, TGF- $\beta$ , IL-6 e IL-10 e quimiocina CCL20 em sobrenadante do macerado de medula e cérebro, expressão de marcadores celulares e citocinas intracelulares por citometria de fluxo em células mononucleares isoladas de cérebro (IL-17<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CTLA4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> e IL-10<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) e análise do infiltrado celular do cérebro e medula, sendo o delineamento experimental esquematizado na figura 5.



**Figura 4** Delineamento experimental

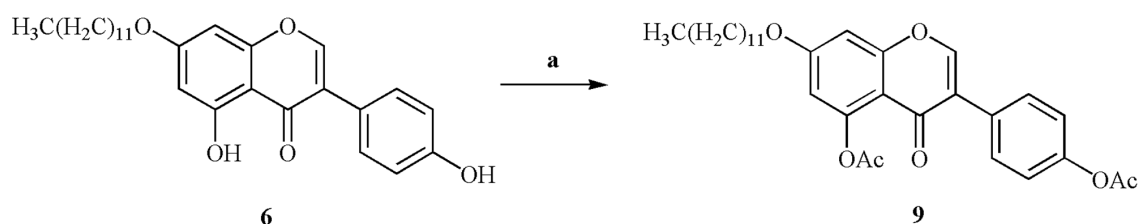
## 4.2 Obtenção dos derivados da genisteína

Os derivados da genisteína foram sintetizados no Departamento de Química, no Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Juiz de Fora. Os ésteres de genisteína **2**, **3**, **4** e **5**, foram preparados por reação da genisteína (**1**) com ácidos graxos na presença de diciclohexilcarbodiimida (DCC) e dimetilaminopiridina (DMAP) em diclorometano (Figura 5). Os éteres de genisteína **6**, **7** e **8** foram obtidos por tratamento da genisteína (**1**) com tert-butóxido do potássio em *N,N*-dimetilformamida (DMF) e adição do correspondente alquil iodeto (Figura 4).



**Figura 5** Preparação dos derivados da genisteína: Monoésteres (**2,3**), diésteres (**4,5**), monoéteres (**6,7**) e diéter (**8**). Reagentes e condições: a) dicitlohexilcarbodiimida, dimetilaminopiridina, diclorometano. b) tert-butóxido do potássio, alquil iodeto.

Na tentativa de confirmar em que posição ocorreu a eterificação dos compostos mono-eterificados, o composto **6** foi submetido à uma reação de acetilação em anidrido acético e piridina conduzindo ao composto di-acetilado **9**, com a intenção de avaliar a influência dos grupos acetil nos deslocamentos dos sinais de H6, H8, H3' e H5' nos espectros de RMN de  $^1H$  dessa forma propor em que posição houve a eterificação. O espectro de RMN de  $^1H$  do composto **9** evidenciou que houve acetilação nas posições 4'-OH e 5-OH por comparação com dados espectroscópicos de análogos descritos na literatura (Al-Maharik e Botting, 2008) indicando que a eterificação ocorreu na posição 7-OH (Figura 6).



**Figura 6** Síntese do composto **9**. Reagentes e condições: a)  $Ac_2O$ , piridina, temperatura ambiente, 24h.



### **4.3 Avaliação do efeito dos derivados de genisteína em macrófagos J774 estimulados com LPS e IFN- $\gamma$**

#### **4.3.1. Linhagem celular e cultura**

Macrófagos J774.A1 ( $2 \times 10^5$  cell/mL) foram cultivados em placas de 96 poços em RPMI-1640 suplementado com 2mM L-glutamina, 100  $\mu$ g/mL de antibiótico (estreptomicina e penicilina), 5% de soro fetal bovino (SFB), mantido a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub>. Os macrófagos foram cultivados por 12, 18 e 48 horas na presença ou ausência de genisteína ou seus derivados nas concentrações de 52, 104 e 208  $\mu$ M e estimulados ou não com LPS (1 $\mu$ g/mL) e IFN- $\gamma$  (0.9 ng/mL) em triplicata. Como controle negativo foram utilizadas células apenas estimuladas com LPS e IFN- $\gamma$  e não tratadas, células não estimuladas com LPS e IFN- $\gamma$ , mas tratadas com genisteína ou derivados e células não estimuladas e tratadas apenas com DMSO 1% (dilúente utilizado na dissolução da genisteína e derivados).

#### **4.3.2 Avaliação da citotoxicidade da genisteína e derivados**

A viabilidade dos macrófagos J774.A1 foi determinada pelo método colorimétrico do MTT (corante *Thiazol Blue Tetrazolium Bromido* - Sigma, St. Louis, MO, USA). Para o teste, após o tempo de cultura de 48 horas os sobrenadantes foram coletados para posterior dosagem de NO e a seguir 100  $\mu$ L de RPMI foram adicionados em todos os poços contendo as células cultivadas por 48 horas, em seguida 10 $\mu$ L de MTT (5mg/mL) também foram acrescentados a cada poço. A placa foi incubada a 37°C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. Transcorrido o período de 4 horas a reação foi finalizada com o acréscimo de 100  $\mu$ L de álcool isopropílico acidificado com HCL 0,4%. A absorbância foi lida a 570 nm e a citotoxicidade (%) obtida pela

fórmula  $100 - ((\bar{x}_1 / \bar{x}_2) * 100)$ , considerando  $\bar{x}_1$  e  $\bar{x}_2$  a média da OD (570nm) nos poços de células tratadas com os derivados e células não tratadas, respectivamente.

#### 4.3.3 Determinação da produção de NO

A concentração de NO (indiretamente determinada pela dosagem de nitrito) foi medida pelo método de Griess, no sobrenadante de 48 horas de cultura. Para realização do teste 100  $\mu$ L de sobrenadante de cada poço foram transferidos para placas de 96 poços, posteriormente foi acrescentado igual volume de reagente de Griess (1% de sulfanilamida, 0,1% de *N*-(1-naftil)-etileno diamina hidrocloreto, 2,5%  $H_3PO_4$ , Sigma, St. Louis, MO, USA). A concentração de NO foi determinada por comparação com uma solução padrão de nitrito de sódio. A absorbância medida a 540 nm. O *N*<sup>G</sup>-monometil-L-arginina (L-NMMA) foi utilizado como padrão positivo do controle da inibição. A porcentagem de inibição foi calculada em relação à inibição do L-NMMA e células apenas estimuladas.

#### 4.3.4 Dosagem de citocinas

As citocinas IL-12 e TNF- $\alpha$  foram quantificadas pelo método de ELISA. As dosagens de IL-12 foram realizadas em sobrenadante após 18 horas de cultura e o TNF- $\alpha$  avaliado em sobrenadante de 12 horas. A leitura da reação foi feita a 450 nm. Os resultados para obtenção da porcentagem de inibição foram calculados usando a fórmula  $100 - ((\bar{x}_1 / \bar{x}_2) * 100)$ , considerando  $\bar{x}_1$  (a média da concentração de IL-12 ou TNF- $\alpha$  (pg/mL) nos poços contendo os compostos analisados) e  $\bar{x}_2$  (a média da concentração IL-12 ou TNF- $\alpha$  (pg/mL) de células somente estimuladas não tratadas).

#### 4.4 Avaliação do derivado TDG no modelo *in vivo* de EAE

##### 4.4.1 Animais

Para a indução da EAE foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 fêmeas, com 8-10 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 na sala de manutenção do laboratório de Imunologia em estantes ventiladas (25°C) e dieta *ad libitum*. Todos os procedimentos foram de acordo com os princípios do Código Brasileiro para a Utilização de Animais de Laboratório. O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais da UFJF (n°026/2008).

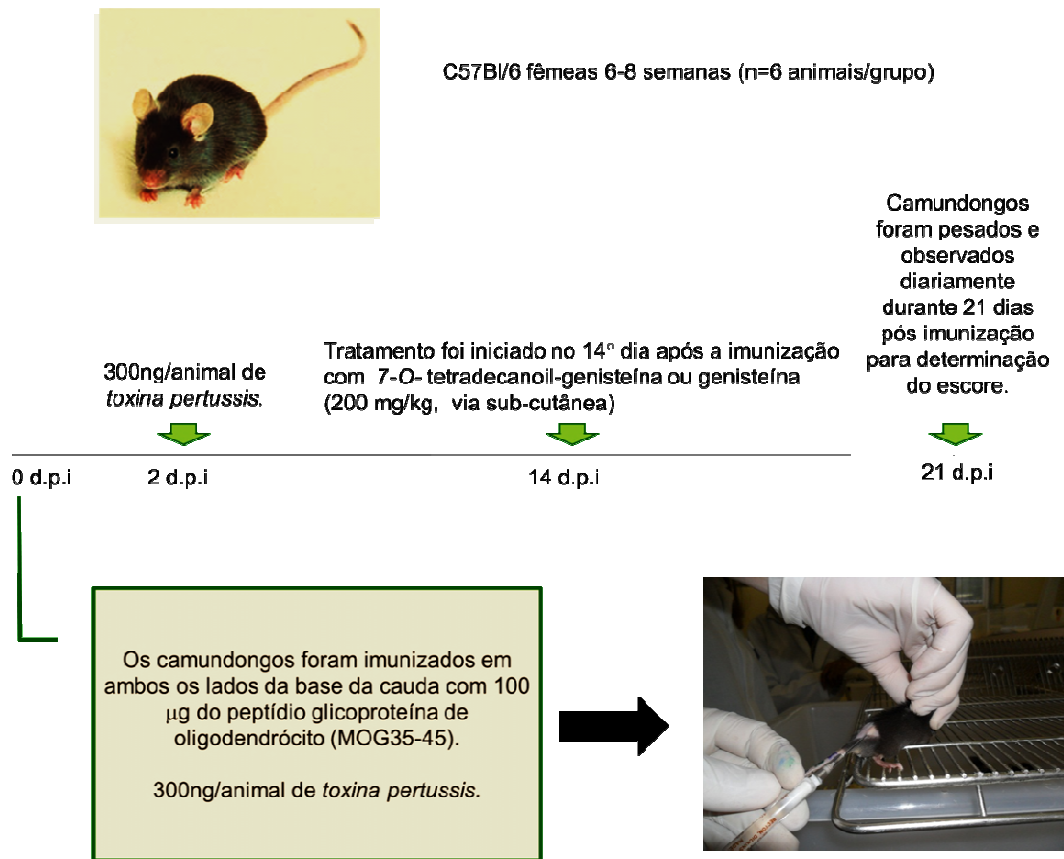
##### 4.4.2 Indução do Modelo de EAE

Os camundongos foram divididos em quatro grupos (17 animais/grupo) (Tabela 1).

**Tabela 1** Distribuição dos animais em grupos, tratamento, dosagem e via de administração dos compostos.

<b>Grupos (17 animais/grupo)</b>	<b>EAE</b>	<b>TRATAMENTO (quantidade/ via de administração)</b>
NT-EAE	Induzido	Não receberá tratamento
Genisteína	Induzido	Tratado com genisteína (200 mg/Kg de peso, s.c.dorsal)
TDG	Induzido	Tratado com TDG (200mg/Kg de peso, s.c dorsal).
CT	Não induzido	Não tratado

Cada animal foi imunizado por via s.c. em ambos os lados da base da cauda com total de 100 µg do peptídeo MOG<sub>35-55</sub> (sintetizado no Laboratório de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo) emulsificado em CFA suplementado com 400 µg de *Mycobacterium tuberculosis* (H37RA; Difco Laboratories, Detroit, MI). No dia da imunização e 48 horas após a imunização os animais receberam 300 ng/mL de toxina pertussis (Sigma, EUA, St. Louis, MO, USA) via i.p., conforme apresentado na figura 7.



**Figura 7** Processo de indução do modelo de encefalomielite autoimune experimental (EAE), período de avaliação do escore clínico.

Os animais foram pesados dia 1 até o 21<sup>o</sup> após a indução do modelo de EAE, quando ocorreu a eutanásia. A análise do escore foi realizada do dia 0 ao 21 após a indução, sendo clinicamente avaliados e classificados com relação à incapacidade

neurológica através da escala apresentada na tabela 2, adaptada por De Paula e colaboradores (2008). O escore final foi realizado somando-se os escores apresentado em cada parte do animal. Após o 14º dia da indução do modelo os animais começaram a ser tratados com 200 mg/Kg como anteriormente estabelecido por De Paula e colaboradores (2008) de genisteína ou TDG por via s.c. durante 7 dias obedecendo-se sempre o mesmo horário.

**Tabela 2** Escala neurológica clínica para avaliar a EAE.

Parte do animal	Sinais clínicos	Escore <sup>a</sup>
Cauda	Nenhum sinal clínico	0
	Perda do tonus muscular da cauda	1
	Paralisia	2
Membro-posterior	Nenhum sinal clínico	0
	Fraqueza de uma das patas do animal	1
	Fraqueza de ambas as patas do animal	2
	Paralisia de uma das patas	3
	Paralisia de ambas as patas	4
Membro-anterior	Nenhum sinal clínico	0
	Fraqueza de uma ou ambas as patas do animal	1
	Paralisia de uma ou ambas as patas do animal	2
Bexiga	Continência	0
	Incontinência	1

<sup>a</sup> Pontuação numérica estabelecida arbitrariamente. (Adaptado: Soucy et al., 2006)

#### **4.4.3 Tratamento com genisteína e derivado 3 (7-O-tetradecanoil-genisteína - TDG)**

Os animais foram tratados através da via s.c. por 7 dias, sendo que a partir do 14º dia após a indução cada animal recebeu 200mg/kg de peso dos compostos utilizados para os tratamentos (De PAULA et al., 2008).

#### **4.4.4 Eutanásia e coleta de tecidos e órgãos dos animais**

Antes da eutanásia o sangue dos animais foi coletado pelo plexo oftálmico. No 21º dia após a imunização, os animais foram eutanaz iados com uma dose letal de xilazina (2%) e ketamina (5%) e perfundidos no ventrículo esquerdo com tampão salina fosfato (PBS).

Os cérebros foram coletados para realização de citometria (8 animais), dosagens de citocinas no sobrenadante (5 animais) e análise histopatológica (4 animais). A medula foi coletada para dosagem de citocinas (13 animais) e análise histopatológica (4 animais). Em função da dificuldade de isolar células mononucleares da medula e pela escassez de tecido obtido foi decidido não realizar a citometria de fluxo neste tecido.

Para a dosagem de citocinas por ELISA os tecidos foram retirados rapidamente e armazenados em freezer -70°C. Os órgãos destinados à análises histopatológicas foram armazenados em formaldeído 10% diluído em PBS.

Os cérebros destinados a citometria de fluxo foram coletados e imediatamente processados para separação das células mononucleares do cérebro e estas foram submetidas aos protocolos de marcação extracelular e intracelular.

Os linfonodos e baços também foram coletados para realização de estudos posteriores.

#### **4.4.5 Isolamento e preparação de células mononucleares do cérebro**

Os cérebros coletados para realização da citometria de fluxo, todos os cérebros do mesmo grupo foram macerados juntos em meio RPMI-1640 com 10% de SFB. O macerado foi passado por um filtro de 70 $\mu$ m (BD Biosciences, Bedford, USA). As células do cérebro foram posteriormente incubadas com RPMI contendo 2 mg 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, conforme descrito por Blacon e colaboradores (2008). À seguir as células foram lavadas em solução de ACK, centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos e resuspensas em PBS, 1% SFB e 0.09% de azida sódica.

#### **4.4.6 Avaliação de marcadores celulares e citocinas intracitoplasmáticas por citometria de fluxo**

Células isoladas do cérebro foram incubadas com anticorpos anti-mouse CD3-peridina-clorofilproteína (PerCP), anti-mouse CTLA-4-ficoeritrina (PE) ou anti-mouse CD4-PerCP (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA). 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 (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, anti-mouse IL-17A-Alexa Fluor 488, anti-mouse Foxp3– Alexa Fluor 488 (BD Biosciences PharMingen, San Diego, USA). A captura das células foi feita utilizando-se o citômetro de fluxo FACS Calibur- OSX e as análises realizadas com *FCS express version 3*.

#### **4.4.7 Dosagens das citocinas (IL-17, IL-6, TGF $\beta$ , IFN- $\gamma$ e IL-10) e da quimiocina (CCL20) por ELISA**

Cérebros e medula espinhal de 5 animais por grupo foram removidos, pesados e homogeneizados (100mg/mL) em solução de extração contendo 0.4 M NaCl, 0.05% de tween 20 (Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, USA), 0.5% de albumina soro bovino, 0.1M de fenilmetilsulfonil fluoride. Placas de ELISA foram sensibilizadas com o anticorpo de captura, diluído em tampão específico conforme especificado no protocolo de instrução (BD Biosciences, Pharmigen, San Diego, USA), incubadas “*over night*”, em seguida lavadas com PBS-Tween quatro vezes e bloqueadas com PBS-Soro Fetal por 30 minutos. Após este período, as placas foram lavadas novamente e, em seguida as amostras e os padrões de citocinas foram adicionados nos poços das placas. As placas foram então incubadas por 18 horas a 4°C. Terminada a incubação, as placas foram lavadas e o 2º anticorpo biotinilado acrescentado. A placa foi incubada por mais 1 hora à temperatura ambiente e mais quatro lavagens foram feitas e, após a colocação do conjugado enzimático estreptavidina-biotina, as placas foram incubadas por mais 1 hora. Transcorrido o tempo de 1 hora, a reação foi revelada pela adição do substrato e por fim bloqueada com ácido sulfúrico 2N e a leitura feita 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 para IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-6, TGF- $\beta$ , IL-10 e CCL20 (BD Biosciences Pharmigen, San Diego, CA, USA).

#### **4.4.8 Análise histológica do cérebro e medula**

Para avaliar o grau de inflamação do SNC, quatro animais por grupo foram eutanaziados no 21º dia após a indução. O cérebro e a medula dos animais foram coletados e armazenados em formaldeído 10% diluído em PBS. Para inclusão em



parafina o cérebro foi dividido em 3 partes por meio de cortes transversais e a medula foi dividida em 4 partes também com cortes transversais. Após a inclusão o material foi cortado em seções 4  $\mu\text{m}$  de espessura, procedeu-se a montagem das lâminas e posteriormente os tecidos foram corados com hematoxilina e eosina (H&E) para avaliação da presença de infiltrados.

As imagens foram obtidas usando o microscópio Olympus BX51 e os resultados foram registrados pelo software Image Pro plus (Media Cybernetics <sup>TM</sup>).

#### **4.4.9 Análise estatística**

Os resultados apresentados nos testes *in vitro* são representativos da média de três experimentos independentes. Os resultados apresentados nos testes *in vivo* são representativos de dois experimentos independentes. Todos os dados foram analisados por teste de Kruskal-Wallis (GraphPad Prism 5.00), e as diferenças foram consideradas para valores de  $p < 0.05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Avaliação do efeito dos derivados da genisteína na viabilidade celular e produção de NO, IL-12 e TNF- $\alpha$ em linhagem de macrófago J774.A1 estimulados com LPS e IFN- $\gamma$

Os resultados obtidos nos experimentos *in vitro*, são representativos de três experimentos independentes. A verificação dos efeitos dos derivados na viabilidade celular foi determinada pelo método colorimétrico de MTT após cultivo dos macrófagos por 48 horas. Os resultados apresentados na Tabela 3 mostram que os compostos testados não foram citotóxicos, pois a viabilidade celular foi 100% para todos os compostos testados.

A avaliação do efeito modulatório dos novos derivados da genisteína em NO, IL-12 e TNF- $\alpha$  produzidos por macrófagos J774.A1 estimulados com LPS e IFN- $\gamma$ , mostram que os compostos **2**, **3**, **5**, **6**, **7** e **8** foram capazes de inibirem a produção de IL-12 pelos macrófagos J774.A1 (Tabela 3). Entretanto, os derivados não foram eficientes na inibição de TNF- $\alpha$ , sendo que apenas o composto **2**, na concentração mais elevada (208  $\mu$ M), promoveu uma redução de 12.9% do TNF- $\alpha$ . Entretanto, a genisteína apresentou-se eficiente na redução de TNF- $\alpha$  em todas as concentrações testadas (Tabela 3).

Os compostos **2**, **3**, **6** e **7** inibiram a produção de NO de maneira dose-dependente. Os diésteres **4** e **5** não foram eficientes na inibição de NO (Tabela 3).

**Tabela 3** Inibição da produção de NO, IL-12 e TNF- $\alpha$  por derivados lipofílicos da genisteína em macrófagos J774A.1 ativados com LPS e IFN- $\gamma$ .

Componentes <sup>a</sup>	NO <sup>c</sup>			IL-12 <sup>d</sup>			TNF- $\alpha$ <sup>d</sup>			Viabilidade celular
	208 <sup>b</sup>	104	52	208	104	52	208	104	52	
2	118.44% ( $\pm 1.1$ ) <sup>e</sup>	102.16% ( $\pm 2.4$ )	50.35% ( $\pm 1.0$ )	83.08% ( $\pm 1.5$ )	86.44% ( $\pm 2.6$ )	84.39% ( $\pm 2.9$ )	12.9% ( $\pm 1.3$ )	10.75% ( $\pm 3.5$ )	3.87% ( $\pm 15.6$ )	100%
3	106.36% ( $\pm 0.8$ )	67.8% ( $\pm 3.2$ )	51.9% ( $\pm 2.7$ )	55.7% ( $\pm 2.4$ )	68.04% ( $\pm 3.7$ )	64.05% ( $\pm 8.2$ )	0%	0%	0%	100%
4	0%	0%	0%	18.91% ( $\pm 1.5$ )	48.32% ( $\pm 1.6$ )	29.59% ( $\pm 0.2$ )	0%	0%	0%	100%
5	0%	0%	0%	76.32% ( $\pm 2.5$ )	81.37% ( $\pm 4.6$ )	68.29% ( $\pm 4.5$ )	0%	0%	0%	100%
6	111.61% ( $\pm 1.5$ )	62.82% <sup>ns</sup> ( $\pm 6.7$ )	34.53% <sup>ns</sup> ( $\pm 0.6$ )	88.71% ( $\pm 2.0$ )	80.31% ( $\pm 4.5$ )	65.67% ( $\pm 1.6$ )	0%	0%	0%	100%
7	90.45% ( $\pm 2.9$ )	50.13% <sup>ns</sup> ( $\pm 1.1$ )	24.28% <sup>ns</sup> ( $\pm 2.2$ )	69.27% ( $\pm 2.7$ )	97.25% ( $\pm 0.9$ )	97.09% ( $\pm 0.1$ )	0%	0%	0%	100%
8	51.88% <sup>ns</sup> ( $\pm 5.4$ )	25.47% <sup>ns</sup> ( $\pm 1.9$ )	11.28% <sup>ns</sup> ( $\pm 3.8$ )	94.35% ( $\pm 3.3$ )	88.95% ( $\pm 0.5$ )	47.78% ( $\pm 1.2$ )	0%	0%	0%	100%
<b>Genisteína</b>	124.93% ( $\pm 0.9$ )	91.48% ( $\pm 1.5$ )	56.71% ( $\pm 4.0$ )	43.88% ( $\pm 1.9$ )	21.5% <sup>ns</sup> ( $\pm 4.2$ )	10.87% <sup>ns</sup> ( $\pm 3.1$ )	77.42% ( $\pm 4.2$ )	70.51% ( $\pm 1.9$ )	62.1% ( $\pm 1.1$ )	100%

<sup>a</sup> Derivados da genisteína: (2,3) monoésteres, (4,5) diésteres, (6,7) monoéteres e (8) diéter.

<sup>b</sup> Concentração das substâncias ( $\mu$ M).

<sup>c</sup> A porcentagem de inibição foi calculada em relação ao L-NMMA e as células estimuladas com LPS e IFN- $\gamma$ . Os resultados foram calculados usando  $100 - ((\bar{X}_1 - A) / (\bar{X}_2 - A)) * 100$ , considerando  $\bar{X}_1$  e  $\bar{X}_2$  a média da concentração de NO ( $\mu$ M) nos poços contendo o análogo e com as células somente estimuladas, respectivamente. "A" corresponde a concentração de NO no sobrenadante das células tratadas com L-NMMA.

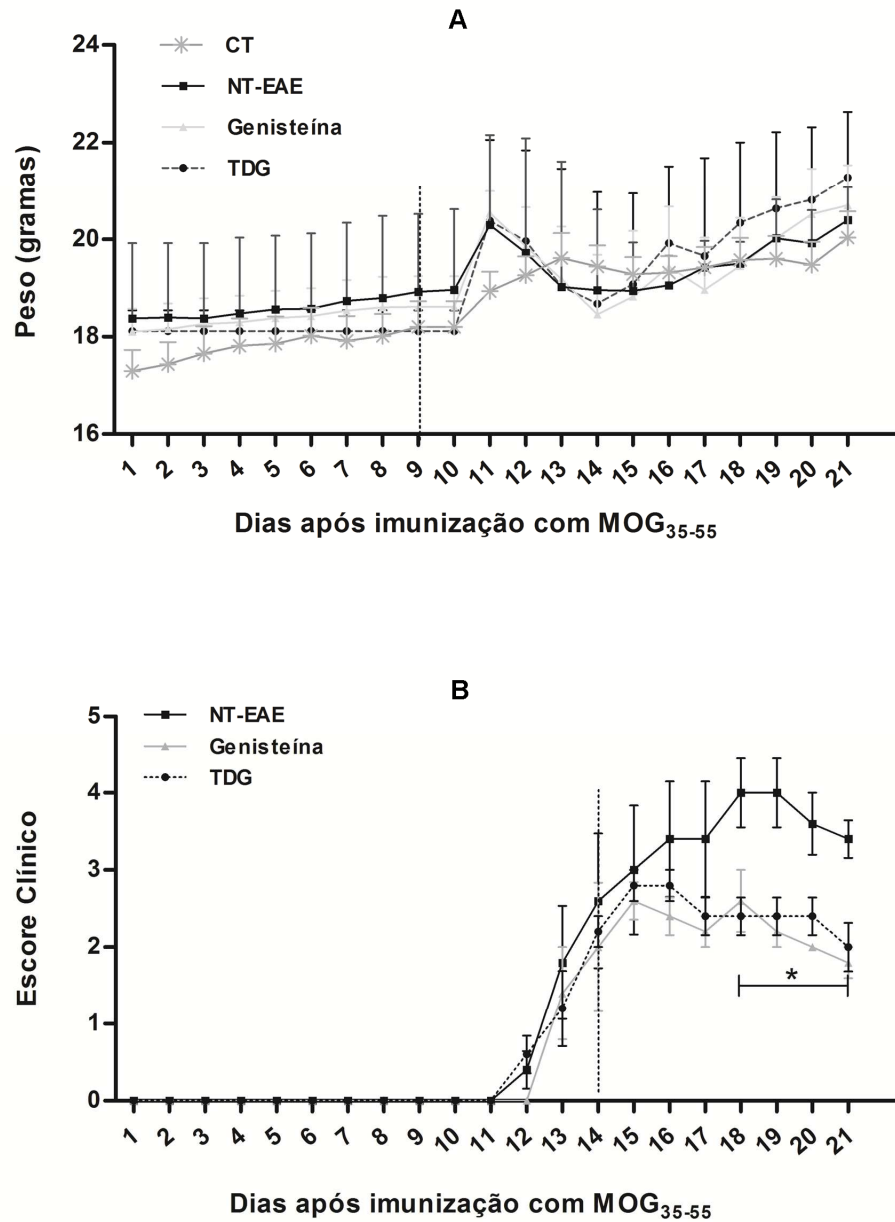
<sup>d</sup> As porcentagens de inibição das citocinas foram calculadas usando a fórmula  $100 - ((\bar{X}_1 / \bar{X}_2) * 100)$ , considerando  $\bar{X}_1$  e  $\bar{X}_2$  a média da concentração de IL-12 ou TNF- $\alpha$  (pg/mL) nos poços contendo os derivados e células apenas, ambos estimulados.

<sup>e</sup> Desvio padrão (resultados são representativos de três experimentos independentes)

<sup>ns</sup> Não significante em relação às células não tratadas.

## 5.2 Avaliação do efeito do derivado TDG e da genisteína nos sinais clínicos dos animais com EAE

Inicialmente foi avaliado o efeito do TDG e da genisteína no curso dos sintomas clínicos da EAE através do peso e escore clínico dos animais que foram registrados durante todo o experimento até o dia do sacrifício (21º dia após a indução). Com relação ao peso, não foi observada variação significativa entre os grupos (Figura 8A). Com relação ao escore clínico o grupo EAE mostrou-se aumentado com relação ao controle à partir do 13º a pós a indução ( $p < 0.01$ ). O pico do escore clínico neste grupo se deu entre os dias 18º e 19º após a indução e decresceu a partir deste ponto. No grupo tratado com o derivado TDG o pico se deu entre os 15º e 16º pós-indução, decrescendo a partir deste dia, sendo que a diminuição do escore com relação ao grupo EAE ocorreu à partir do 18º dia após a indução até o 21º dia do sacrifício ( $p < 0.05$ ). No grupo tratado com genisteína o pico do escore clínico se deu no 15º dia pós-indução, diminuiu e tornou a aumentar entre o 17º e 18º dia após a indução, entretanto, ocorreu um decréscimo do escore a partir do 18º dia pós-indução, que se manteve até o dia do sacrifício. Entre os grupos tratados com derivado TDG e genisteína não ocorreu diferença no escore clínico (Figura 8B).



**Figura 8** Média do peso e escore clínico. (A) Peso dos camundongos (n=17 por grupo) imunizados ou não com peptídeo MOG<sub>35-55</sub>. (B) Escore clínico de camundongos (n=17 por grupo) imunizado com peptídeo MOG<sub>35-55</sub>. Os sinais clínicos foram registrados do dia 0 até o dia 21 após a imunização. Tratamento com TDG ou genisteína tiveram início no 14º dia após a imunização. CT= grupo não imunizado, NT-EAE= grupo imunizado não tratado, genisteína= grupo imunizado tratado com genisteína e TDG= grupo imunizado tratado com O-tetradecanoil-genisteína. Cada ponto representa a média±SEM. \*p<0.01 de genisteína versus NT-EAE e TDG versus NT-EAE.

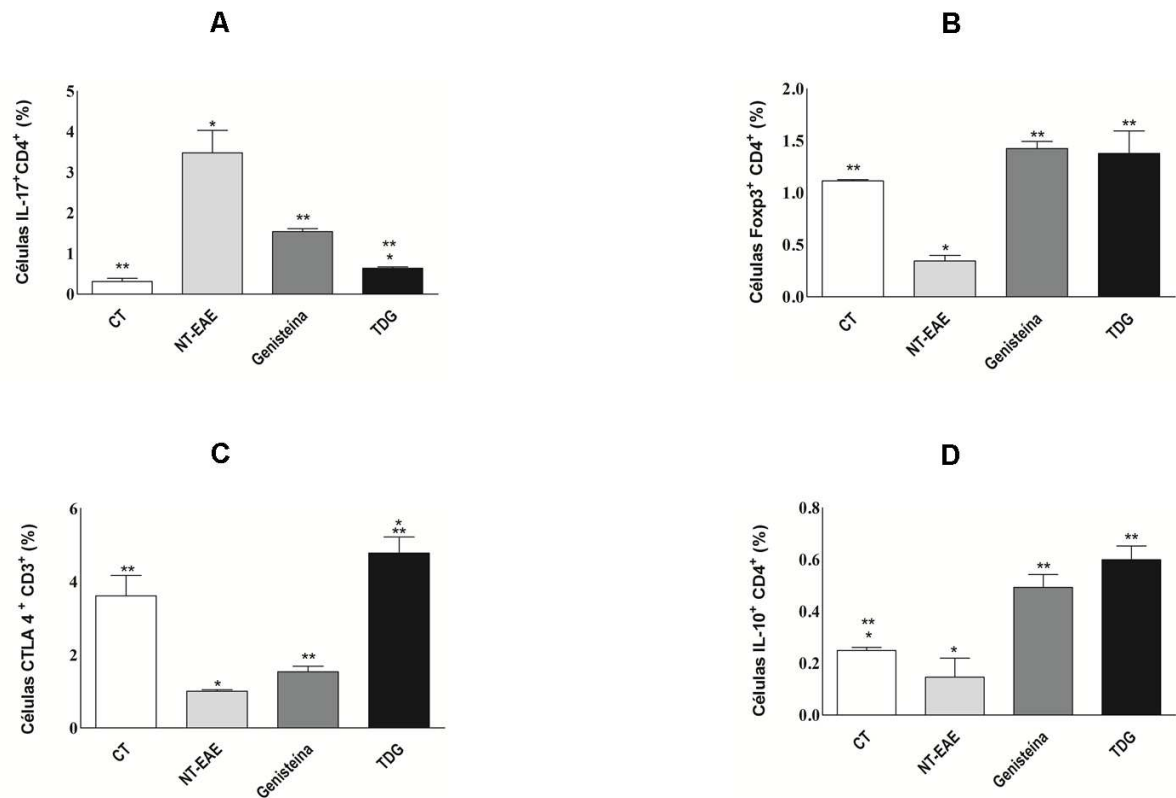
### **5.3 Tratamento com TDG reduz a porcentagem de células produtoras de IL-17, aumenta a porcentagem de células expressando Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CTLA-4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> e células CD4<sup>+</sup> produzindo IL-10 no cérebro**

O número de células mononucleares isoladas do cérebro foram  $0.2 \times 10^5$  (CT),  $7 \times 10^5$  (NT-EAE),  $2.2 \times 10^5$  (TDG) e  $1.5 \times 10^5$  (genistein). A indução da EAE promoveu um aumento na porcentagem de células T CD4<sup>+</sup> produtoras de IL-17 no cérebro dos animais. Este resultado pode ser observado quando comparamos o grupo NT-EAE como o grupo controle não induzido (CT) ( $p < 0.05$ ). O tratamento com o TDG reduziu a porcentagem de células IL-17<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> em quantidades inferiores ao grupo genisteína ( $p < 0.05$ ) (Figura 9A).

De acordo com os resultados obtidos, a indução da EAE promoveu um decréscimo na porcentagem de células T CD4<sup>+</sup> expressando o fator de transcrição Foxp3 em relação ao grupo CT ( $p < 0.05$ ). Entretanto, o tratamento com TDG aumentou a população celular CD4<sup>+</sup> expressando Foxp3 em quantidades equivalentes ao grupo CT, assim como a genisteína (Figura 9B).

A indução reduziu a porcentagem de células CTLA-4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> no grupo NT-EAE em relação ao grupo CT (Figura 9C). O tratamento com TDG aumentou a porcentagem de células CD3<sup>+</sup> expressando CTLA-4, o que também pode ser observado no tratamento com genisteína, entretanto, aumento neste caso foi significativamente inferior em relação ao grupo TDG (Figura 9C).

A porcentagem de células CD4<sup>+</sup> produzindo IL10 no cérebro foi menor no grupo NT-EAE em relação ao grupo CT ( $p < 0.05$ ). O TDG aumentou a porcentagem de células T CD4<sup>+</sup> produtoras de IL-10<sup>+</sup> em comparação ao grupo NT-EAE (Figura 9D), este aumento também foi observado no grupo tratado com genisteína em relação ao grupo NT-EAE (Figura 9D).



**Figura 9** Porcentagem de células T IL-17<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>(A), Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>(B), CTLA-4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> (C) e IL-10<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (D) determinada por citometria de fluxo de células mononucleares isoladas do cérebro (n=8 animais por grupo) no 21º dia após a imunização com peptídeo MOG<sub>35-55</sub>. Tratamento com TDG ou genisteína tiveram início no 14º dia após a imunização. CT= grupo não imunizado, NT-EAE= grupo não imunizado não tratado, genisteína= grupo imunizado tratado com genisteína e TDG= grupo imunizado tratado com O-tetradecanoil-genisteína. \* = p < 0.05 versus genisteína. \*\* = p < 0.05 versus NT-EAE.

#### **5.4 Tratamento com TDG reduz a concentração de IL-17, IFN- $\gamma$ e IL-6 em homogenato de cérebro e medula sem alterar as concentração de TGF- $\beta$ . A concentração de IL-10 no homogenato de medula aumenta no tratamento com TDG**

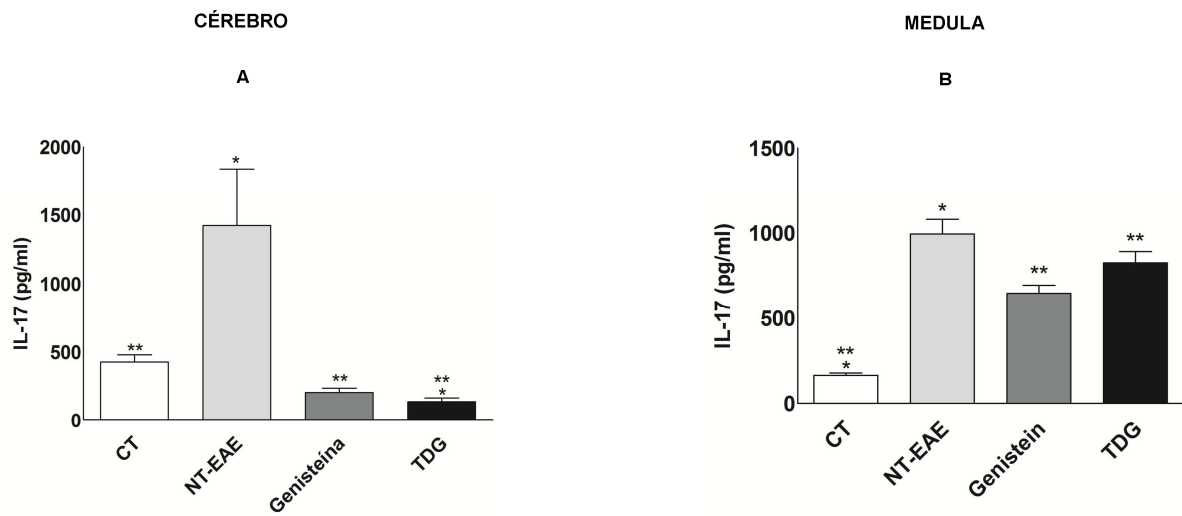
A dosagem de IL-17 no macerado de cérebro e medula (Figura 10A,B) demonstra que a concentração desta citocina foi menor no grupo TDG em comparação ao grupo NT-EAE ( $p < 0.05$ ) (Figura 10A,B). No cérebro a concentração de IL-17 foi menor no tratamento com TDG em relação ao tratamento com genisteína ( $p < 0.05$ ) (Figura 10A). Na medula não foi verificada diferença na concentração de IL-17 entre os tratamentos com TDG ou genisteína (Figura 10B).

A indução da EAE elevou a produção de IFN- $\gamma$  no cérebro e medula que é apresentado pela alta concentração de IFN- $\gamma$  do grupo NT-EAE em relação o grupo CT ( $p < 0.05$ ) (Figura 10A,B). O tratamento com TDG reduziu a concentração de IFN- $\gamma$  no cérebro e medula, assim como, o tratamento com genisteína ( $p < 0.05$ ) (Figura 11A,B).

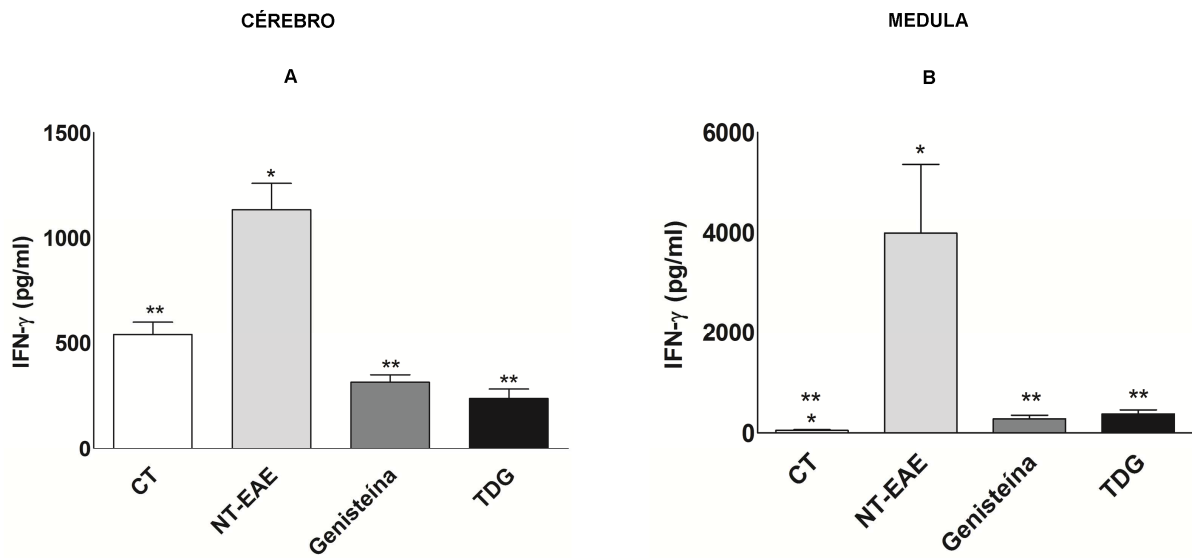
A citocina IL-6 que aparece elevada no grupo NT-EAE em relação ao grupo CT, foi igualmente reduzida no tratamento com TDG e genisteína no cérebro e medula ( $p < 0.05$ ) (Figura 12A,C). Assim como a IL-6, o TGF- $\beta$  também aparece em concentração significativamente mais elevada no grupo NT-EAE em relação ao grupo CT. Entretanto, os tratamentos com TDG ou genisteína não promoveram uma redução significativa do TGF- $\beta$  em relação ao grupo NT-EAE no cérebro, contudo os tratamentos apresentam uma tendência à redução do TGF- $\beta$  (Figura 12B). A concentração do TGF- $\beta$  na medula não foi diferente entre o grupo TDG e NT-EAE ( $p > 0.05$ ), entretanto, a genisteína estimulou a produção de TGF- $\beta$  em comparação ao grupo NT-EAE (Figura 12D) ( $p < 0.05$ ).

A produção de IL-10 na medula também foi estimulada pelo tratamento com TDG em relação ao grupo NT-EAE (Figura 13). O aumento de IL-10 promovido pelo tratamento com TDG foi maior do que o observado no grupo tratado com genisteína ( $p < 0.05$ ), apesar de ambos terem estimulado a produção de IL-10 quando comparados ao grupo NT-EAE ( $p < 0.05$ ).

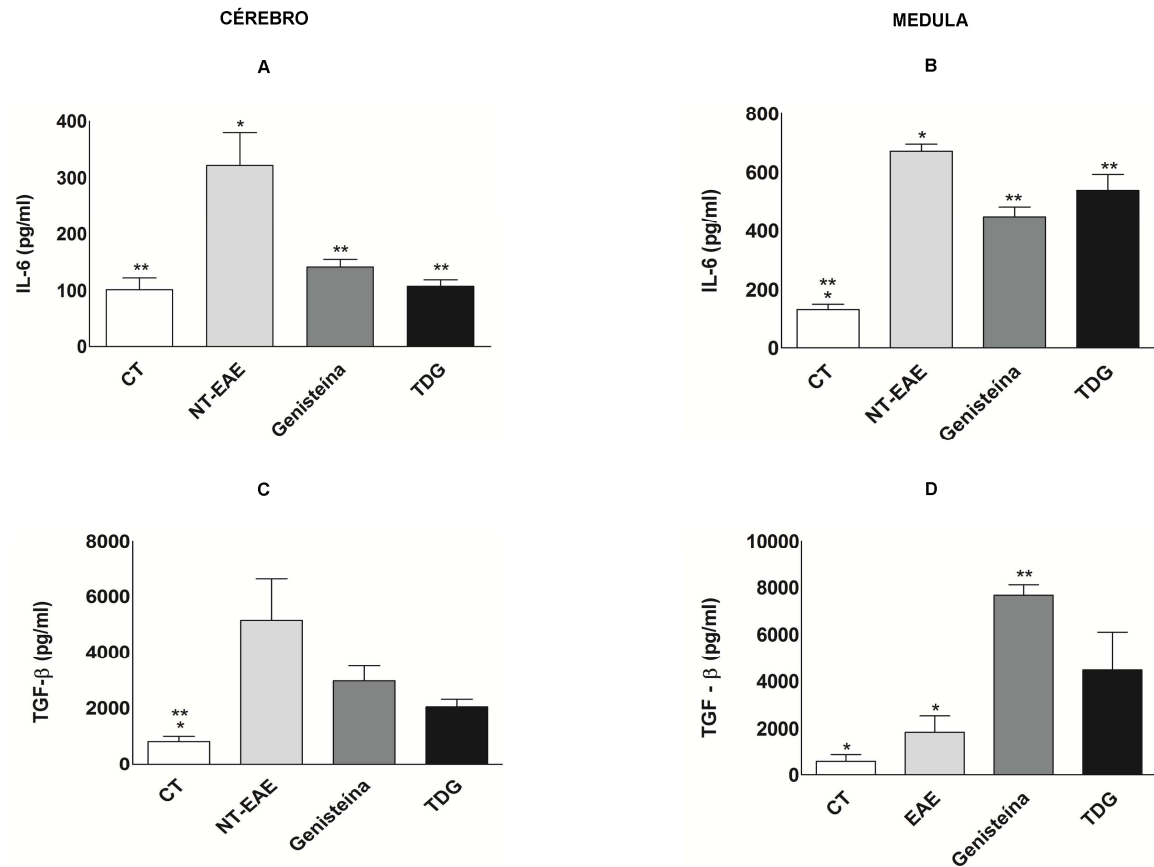




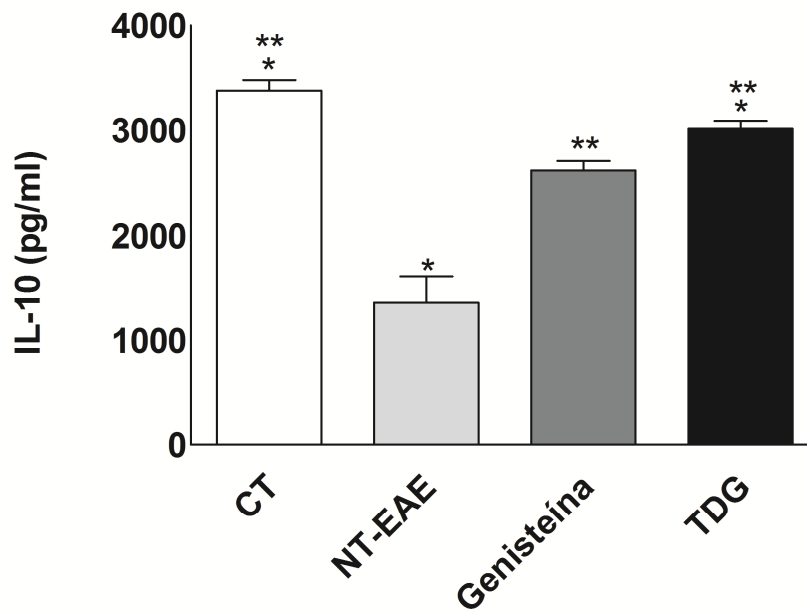
**Figura 10** Concentração de IL-17 no homogenato de cérebro (A) e medula (C) (n=5 animais por grupo) medidas por ELISA no 21º dia após a imunização com peptídeo MOG<sub>35-55</sub>. Tratamento com TDG ou genisteína tiveram início no 14º dia após a imunização. CT= grupo não imunizado, NT-EAE= grupo imunizado não tratado, genisteína= grupo imunizado tratado com genisteína e TDG= grupo imunizado tratado com O-tetradecanoil-genisteína. \* = p < 0.05 versus genisteína. \*\* = p < 0.05 versus NT-EAE.



**Figura 11** Concentração de IFN- $\gamma$  em cérebro e medula. As concentração de IFN- $\gamma$  foram medidas por ELISA no 21º dia após imunização com peptídeo MOG<sub>35-55</sub> em homogenato de cérebro (A) e medula (B). CT= grupo não imunizado, NT-EAE= grupo imunizado não tratado, genisteína= grupo imunizado tratado com genisteína e TDG= grupo imunizado tratado com O-tetradecanoil-genisteína. \* =  $p < 0.05$  versus genisteína. \*\* =  $p < 0.05$  versus NT-EAE.



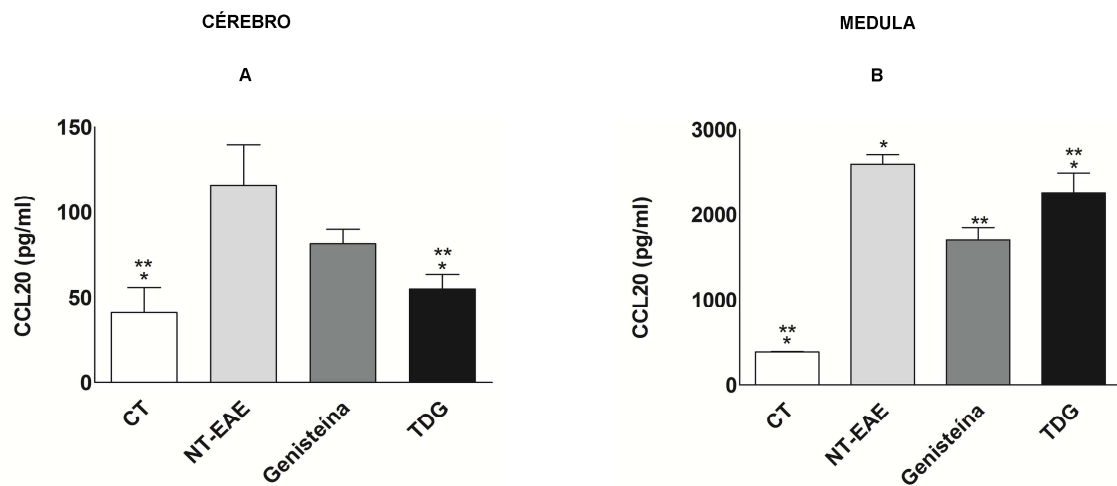
**Figura 12** Concentração de IL-6 (A,B) e TGF-β (C,D) em homogenato de cérebro e medula. As concentrações de IL-6 e TGF-β foram medidas por ELISA no 21º dia após imunização com peptídeo MOG<sub>35-55</sub>. CT= grupo não imunizado, NT-EAE= grupo imunizado não tratado, genisteína= grupo imunizado tratado com genisteína e TDG= grupo imunizado tratado com O-tetradecanoil-genisteína. \* = p < 0.05 versus genisteína. \*\* = p < 0.05 versus NT-EAE.



**Figura 13** Concentração de IL-10 no homogenato de medula (n=5 animais por grupo) medidas por ELISA no 21º dia após imunização com peptídeo MOG<sub>35-55</sub>. Tratamento com TDG ou genisteína tiveram início no 14º dia após a imunização. CT= grupo não imunizado, NT-EAE= grupo imunizado não tratado, genisteína= grupo imunizado tratado com genisteína e TDG= grupo imunizado tratado com O-tetradecanoil-genisteína. \* = p < 0.05 versus genisteína. \*\* = p < 0.05 versus NT-EAE.

### **5.5 Análise da quimiocina CCL20 no macerado de cérebro e medula dos camundongos C57Bl/6 tratados com TDG**

Ao analisar a concentração de CCL20 no macerado de cérebro e medula pode-se observar um aumento de CCL20 no grupo NT-EAE quando comparado ao grupo CT tanto no cérebro como na medula ( $p < 0.05$ ) (Figura 13A,B). O tratamento com TDG reduziu a concentração de CCL20 em relação ao grupo NT-EAE, no cérebro e na medula ( $p < 0.05$ ) diferente do tratamento com genisteína que reduziu a concentração de CCL20 apenas na medula, entretanto, esta redução foi maior do que a observada no tratamento com TDG ( $p < 0.05$ ) (Figura 13).

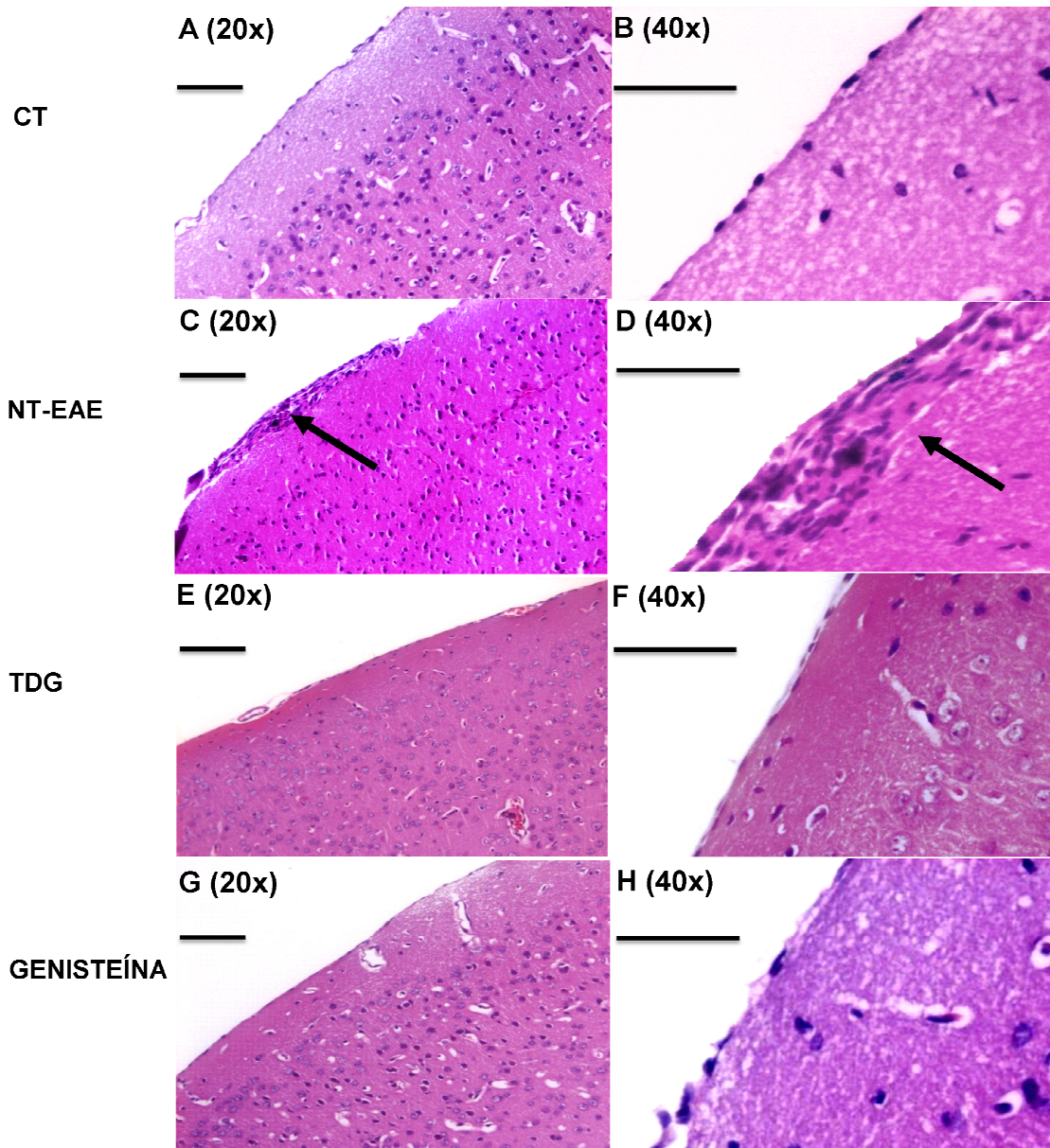


**Figura 14** Concentração de CCL20 em cérebro e medula. A concentração de CCL20 foi medida por ELISA no 21º dia após imunização com peptídeo MOG<sub>35-55</sub> em homogenato de cérebro (A) e medula (B). CT= grupo não imunizado, NT-EAE= grupo imunizado não tratado, genisteína= grupo imunizado tratado com genisteína e TDG= grupo imunizado tratado com O-tetradecanoil-genisteína. \* =  $p < 0.05$  versus genisteína \*\* =  $p < 0.05$  versus NT-EAE.

## **5.6 O derivado TDG reduz o infiltrado celular no cérebro e medula de animais com EAE em relação ao grupo não tratado**

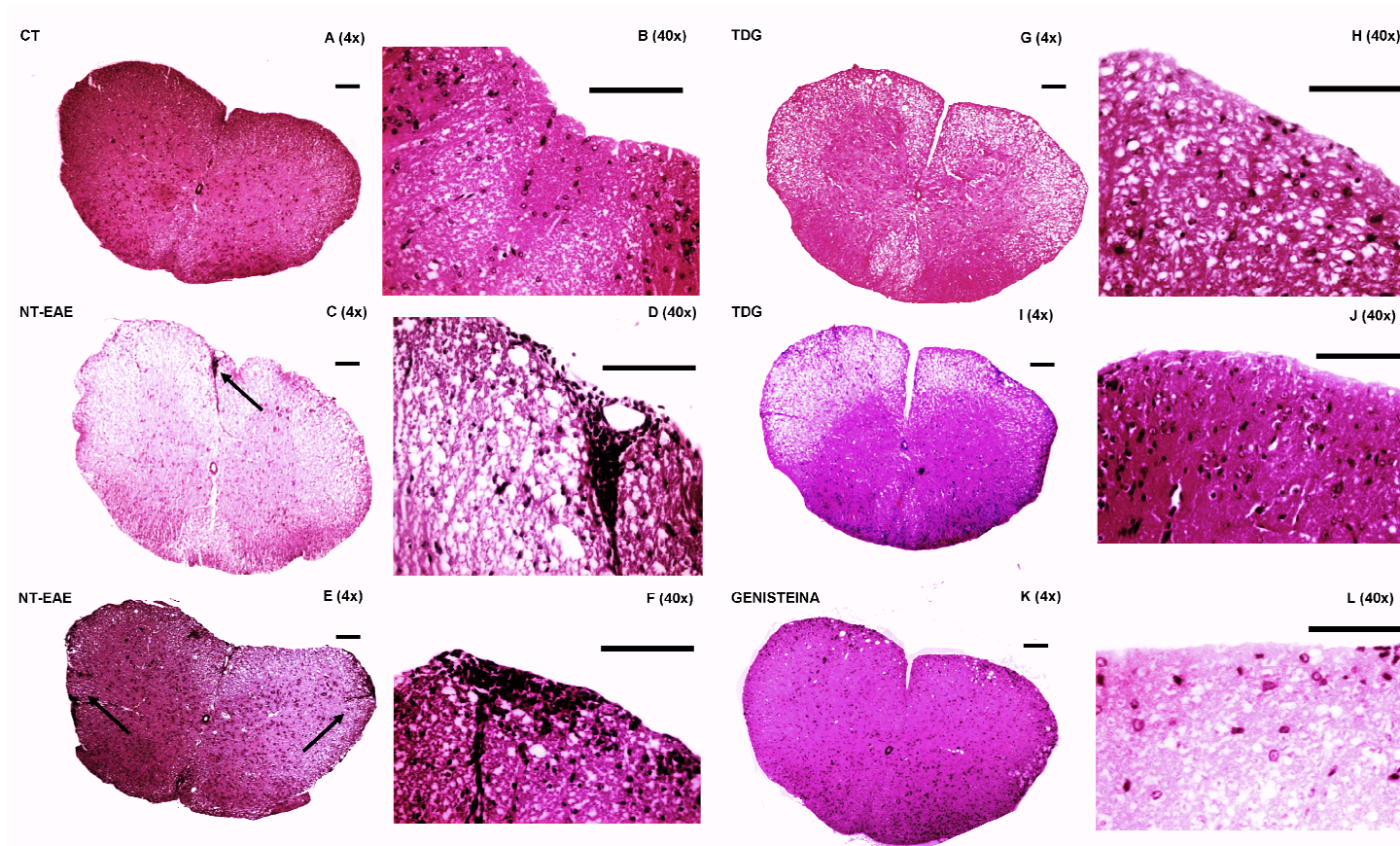
Na análise histológica de lâminas dos tecidos de cérebro e medula, coradas com H&E, foi observado inicialmente que a indução da EAE promoveu a formação de um infiltrado celular inflamatório no SNC dos animais induzidos (grupo NT-EAE) em relação ao grupo controle negativo não induzido (grupo CT). Os cortes histológicos do cérebro (Figura 15A,B) e medula (Figura 16A,B) do grupo CT, foram considerados normais, ou seja, sem presença de infiltrado celular inflamatório. Em contraste todos os animais do grupo NT-EAE apresentaram infiltrado celular inflamatório meningeal no cérebro, representado na figura 15 (C,D). Na medula dos animais do grupo NT-EAE foi possível verificar a presença também de focos periféricos de infiltrado celular inflamatório (Figura 16C,D,E,F).

Nas análises dos cortes histológicos de cérebro (Figura 15E,F) e medula (Figura 16G,H,I,J) dos animais tratados com TDG, assim como, nos animais tratados com genisteína, não foram observados infiltrados inflamatórios meningeais. O aspecto geral dos cortes histológicos de cérebro e medula do grupo TDG e genisteína é semelhante ao grupo CT, exceto pela presença de uma vacuolização também observada no grupo NT-EAE e ausente no grupo CT.



**Figura 15.** Cérebros de camundongos C57Bl/6 imunizados com peptídeo MOG<sub>35-55</sub>. As figuras são representativas da análise histológica de cada grupo experimental: CT= grupo não imunizado (A, B), NT-EAE= grupo imunizado não tratado (C, D), TDG= grupo imunizado tratado com O-tetradecanoil-genisteína tratado (E, F), genisteína= grupo imunizado tratado com genisteína (G, H), coradas com H&E e capturadas em uma magnificação de 20x (A, C, E e G) e 40x (B, D, F e H), escala de barra= 100 μm. Nos cortes histológicos de cérebros dos C57Bl/6 pertencentes ao grupo NT-EAE (C,D) observa-se a presença de infiltrado celular inflamatório meningeal (setas) ausente no grupo CT (A, B) que apresenta uma histologia normal sem regiões inflamatórias. No tratamento com TDG (E, F) ou com genisteína (G, H) também não foi observado infiltrado celular inflamatório, a histologia do cérebro dos animais dos grupos tratados foi semelhante ao grupo CT (A, B).





**Figura 16.** Medulas de camundongos C57Bl/6 imunizados com peptídeo MOG<sub>35-55</sub>. As figuras são representativas da análise histológica de cada grupo experimental: CT= grupo não imunizado (A, B), NT-EAE= grupo imunizado não tratado (C, D, E e F), TDG= grupo imunizado tratado com O-tetradecanoil-genisteína tratado (G, H, I e J), genisteína= grupo imunizado tratado com genisteína (K, L), coradas com H&E e capturadas em uma magnificação de 4x (A, C, E, G, I e K) e 40x (B, D, F, H, J e L), escala da barra= 50µM (4x) e 100µM (40x). Nos cortes histológicos da medula dos animais pertencentes ao grupo CT (A, B) foi observado um tecido normal sem infiltrado inflamatório, em contraste os cortes histológicos de medula dos camundongos do grupo NT-EAE (C, D, E e F) apresentaram infiltrados celulares inflamatórios (setas). No tratamento com TDG (G, H, I e J) ou com genisteína (K, L) também não foi observado infiltrado celular inflamatório, semelhante ao observado no grupo CT (A, B).

## 6 DISCUSSÃO

A genisteína (4', 5, 7 – trihidroxisoflavone) é um isoflavonóide que atua através de diferentes mecanismos celulares tais como, decréscimo de mediadores pró inflamatórios (NO, IL-12 e TNF- $\alpha$ ), inibição da via do NF- $\kappa$ B, inibição p38 MAPK, além de interagir com os receptores estrogênicos, sendo diversos estudos direcionados principalmente a sua aplicação em alterações fisiológicas de origem hormonal (AKIYAMA et al., 1987; SETCHELL et al., 2005; COMALADA et al., 2006; DIJSSELBLOEM et al., 2007). Entretanto, a genisteína apresenta algumas desvantagens relacionadas à sua estrutura química, como baixo nível sérico na sua forma livre, rápido metabolismo entero-hepático dando origem aos conjugados glucoronídeo e sulfato de genisteína, sendo estes fatores que limita sua aplicação clínica (LEWIS et al., 2000; POLKOWSKI et al., 2004; CAVE et al., 2007).

A lipofilicidade é uma característica importante para atividade de uma substância por promover maior difusão através das membranas biológicas aumentando a concentração intracelular do composto (POLKOWSKI *et al.*, 2004). Os derivados da genisteína apresentados neste estudo são mais lipofílicos do que a genisteína, em função da introdução de cadeias de hidrocarbonetos com formação de ésteres e éteres. A esterificação *in vivo* é uma reação que normalmente ocorre com os estrogênios endógenos, sendo que assim como os estrógenos endógenos os fitoestrógenos também podem sofrer esta esterificação, fato que contribui para a atividade antioxidante destes compostos. Desta forma, a esterificação prévia *in vitro*, poderia originar um composto biologicamente mais ativo (MENG et al., 1999; LEWIS et al., 2000; Badeau et al., 2005 ).

Neste estudo inicialmente foi avaliado o efeito dos derivados da genisteína na produção de NO, TNF- $\alpha$  e IL-12 por células J774A.1 ativadas com LPS e IFN- $\gamma$ , onde pode-se observar uma atividade inibitória similar à da genisteína, exceto para o TNF- $\alpha$ .

Neste trabalho os derivados da genisteína apresentaram diferentes efeitos na produção de NO, IL-12 e TNF- $\alpha$ . Os derivados da genisteína inibiram a produção de NO e IL-12, em contraste não apresentaram efeito inibitório na produção de TNF- $\alpha$ . Este perfil de modulação com inibição de IL-12, mas não de TNF- $\alpha$  ou mesmo o

aumento de TNF- $\alpha$ , já foi relatado na literatura para outras substâncias com atividade anti-inflamatória (HO et al., 2001; ROGERS et al., 2005).

Rogers e colaboradores (2005) investigaram a ação imunomoduladora do polifenol epigallocatequina galato, presente no chá verde, em modular a resposta imune em uma cultura primária de células dendríticas isoladas da medula óssea de camundongos Balb/c estimulados com LPS, peptídeo muramil ou infectados com *Legionella pneumophila*. Os resultados obtidos neste estudo mostram que o epigallocatequina galato é capaz de inibir a produção de IL-12 de maneira dose-dependente, mas em contraste aumenta a produção de TNF- $\alpha$ .

A aspirina que é amplamente utilizada por suas propriedades antiinflamatórias foi avaliada na regulação da resposta imune em cultura de células dendríticas estimuladas com LPS. Os resultados obtidos demonstram que a aspirina é capaz de reduzir a produção de IL-12 e aumentar a produção de TNF- $\alpha$  por células dendríticas estimuladas com LPS (HO et al., 2001).

Comalada e colaboradores (2006) trabalhando *in vitro* com macrófagos de medula óssea de camundongos Balb/c demonstraram o efeito dos flavonóides quercetina, apigenina, luteolina e diosmetina na inibição da expressão de óxido nítrico sintase. Entretanto, os resultados deste estudo mostraram que a genisteína e daidzeína não apresentaram uma inibição expressiva da produção de NO. No presente estudo os derivados monoésteres **2** e **3** e o monoéter **6** tiveram similar capacidade para inibir a produção de NO em comparação com a genisteína.

A atividade inibitória dos derivados de genisteína avaliados neste estudo na produção NO e IL-12 pode estar relacionada com a inibição da via de NF- $\kappa$ B, de forma que estes derivados podem estar atuando de maneira similar à genisteína. Estudos relatam o papel da genisteína em atuar promovendo a retenção de NF- $\kappa$ B no citoplasma impedindo sua translocação para o núcleo (AKIYAMA et al., 1987; GADGEEL et al., 2009). Dijsselbloem e colaboradores (2007) relatam a capacidade da genisteína em aumentar a expressão p53 uma proteína repressora de NF- $\kappa$ B, consequentemente promovendo um decréscimo na produção de IL-12. A incapacidade em inibir o TNF- $\alpha$  provavelmente envolve uma via independente de NF- $\kappa$ B. Diversos estudos descrevem vias independentes de NF- $\kappa$ B para a produção de TNF- $\alpha$ , tais como, proteína quinase ativadora de mitogênese, ERK1 and ERK2, c-

Jun N-terminal kinases (LIU et al., 1994; SWEET e HUME, 1996; HAMBLETON et al., 1996).

Desta forma, após os estudos *in vitro* foi feita a escolha do TDG no tratamento de camundongos C57Bl/6 induzidos com EAE, principalmente pela manutenção da capacidade de inibir os mediadores inflamatórios na menor concentração testada (52  $\mu$ M), por suas características físico-químicas como o grau de solubilidade do composto e também pela quantidade disponível deste derivado para o uso nos testes *in vivo*. De Paula e colaboradores (2008) já mostraram o efeito benéfico da genisteína em reduzir os sinais clínicos da EAE através da inibição de citocinas pró-inflamatórias no SNC (De PAULA et al., 2008).

Os resultados obtidos neste estudo mostram que o tratamento com TDG melhora os sinais clínicos da EAE por promover a redução de células produtoras de IL-17, redução de citocinas IL-17, IL-6 e IFN- $\gamma$ , aumento na porcentagem de células T Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> e aumento de IL-10 no SNC dos animais que receberam este derivado lipofílico da genisteína.

A patogênese da EAE é hoje atribuída principalmente a células Th17 e as citocinas relacionadas a este tipo celular principalmente a IL-17 (HUPPERT et al., 2010). Os tratamentos utilizando TDG ou genisteína promoveram um decréscimo na porcentagem de células T produzindo IL-17 no cérebro dos animais com EAE. Floris e colaboradores (2004) demonstraram em seus estudos o envolvimento da IL-17 em romper a barreira hematoencefálica, um dos principais eventos iniciais na patogênese da EAE. Segundo Floris e colaboradores (2004) a IL-17 atua formando espécies reativas de oxigênio que irão atuar sobre as proteínas de junção das células endoteliais prejudicando a atuação destas proteínas e consequentemente facilitando a entrada de células no SNC. Estudos utilizando anticorpos neutralizantes de IL-17 previnem o rompimento da barreira hematoencefálica e promovem a melhora dos sinais clínicos da EAE (KOMIYAMA et al., 2006). Neste trabalho foi demonstrado que camundongos deficientes na produção de IL-17 apresentam uma inibição significativa no desenvolvimento da EAE e um atraso no início da doença e baixo escore clínico em relação ao tipo selvagem.

Neste trabalho as concentrações das citocinas IL-17 e IL-6 no homogenato de cérebro e medula sofreram redução no tratamento com TDG. A IL-6 é uma

importante citocina envolvida na diferenciação de células T “naive” para o subtipo Th17 (ZHOU et al., 2007; BETELLI et al., 2006; MANGAN et al., 2006). A IL-6 aumenta a expressão do fator de transcrição de receptores órfãos nucleares relacionados (ROR- $\gamma$ t) e conseqüentemente estimulando a diferenciação de células Th17 (ZHOU et al., 2007).

O tratamento com TDG também promoveu um aumento na porcentagem de células CD4<sup>+</sup> expressando Foxp3 que o um fator de transcrição essencial para a estabilidade funcional de células Tregs (CHEN et al., 2003). A importância das células T em suprimir a EAE é atualmente reconhecida (KOHM et al., 2002; ZHANG et al., 2011). Zhang e colaboradores (2011) atribuem a melhora da EAE no tratamento com o composto natural  $\beta$ - elemeno, isolado da planta medicinal *Rhizoma zedoariae*, à capacidade desta substância em estimular a diferenciação de células Tregs e inibir a polarização de células Th17. A geração de Tregs está relacionada a presença de citocina TGF- $\beta$  (CHEN et al., 2003; BETELLI et al., 2006). A concentração do TGF- $\beta$  no cérebro e medula não foi alterada pelo tratamento com TDG. Segundo Betelli e colaboradores (2006) o TGF- $\beta$  tanto pode influenciar a diferenciação de células Th17 como favorecer o perfil de células T reguladoras. Na presença de IL-6 o TGF- $\beta$  atuaria induzindo a polarização Th17, entretanto, na ausência de IL-6 ele favoreceria a diferenciação de Tregs. Estes dados reafirmam os resultados apresentados neste estudo uma vez que o tratamento com TDG promoveu a redução de IL-17 e IL-6 sem alterar a concentração de TGF- $\beta$ .

Para reafirmar nossa hipótese de que o tratamento com TDG pode melhorar os sinais clínicos através do aumento de células Tregs, foi demonstrado no presente estudo que o tratamento com TDG aumenta também a produção da citocina IL-10 que é secretada principalmente por células Tregs (SPACH et al., 2006). A citocina IL-10 tem sido caracterizada por sua atividade supressora de células T efetoras, o que promoveria a redução dos sinais clínicos da EAE (CUA et al., 2001; CHEN et al., 2003; ZHANG et al., 2004; SPACH et al., 2006).

Além disso, o tratamento com TDG aumentou também a expressão de antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico (CTLA-4). O CTLA-4 é expresso por células T e se liga ao CD80 e CD86 presentes nas APCs, competindo com a molécula co-estimulatória CD28 (ALEGRE et al., 2001). O CTLA-4 é um regulador

da resposta imune das células T e exerce um papel importante na função supressora das células Tregs (WING et al., 2008). Hurwitz e colaboradores (2002) mostraram a capacidade da expressão de CTLA-4 na contenção da expansão de células T encefalitogênicas na EAE. Desta forma, é possível que o aumento de células CD3 expressando CTLA-4 possa ter favorecido a atividade das Tregs no controle da EAE no grupo tratado com TDG.

Estando evidente o papel do TDG na regulação de células T CD4<sup>+</sup> produtoras de IL-17 foi analisado a influência deste tratamento na produção da quimiocina CCL20, um ligante do CCR6 expresso em células Th17. No presente estudo tratamento com TDG promoveu a redução da concentração de CCL20 no SNC. Estudos desenvolvidos por Reboldi e colaboradores (2009), demonstraram que camundongos deficientes em CCR6 são resistentes a indução da EAE, provavelmente pela incapacidade de penetração de células no SNC.

Como abordado ao longo do texto, atualmente as células Th17 são consideradas as principais responsáveis pelo desenvolvimento da EAE, entretanto, ela compartilha o seu envolvimento nesta patologia com as células Th1, que foram inicialmente consideradas as células efetoras da resposta autoimune da EAE (RENNO et al., 1995; JUEDES et al., 2000). Dentro deste contexto, investiga-se a concentração do IFN- $\gamma$ , citocina produzida por células Th1, diretamente correlacionada com a gravidade da EAE (RENNO et al., 1995; JUEDES et al., 2000; HEDEGAARD et al., 2008). O tratamento com TDG também mostrou-se eficiente em reduzir a produção de IFN- $\gamma$  tanto no cérebro como na medula.

No objetivo de complementar os resultados de citocinas e quimiocinas identificadas e quantificados no cérebro e medula dos animais, foi também realizado neste estudo a análise histológica de cérebro e medula.

As análises histológicas dos tecidos de cérebros e medulas, dos animais pertencentes aos grupos experimentais, demonstraram que a indução da EAE promoveu a formação de infiltrado inflamatório celular no cérebro e medula dos animais induzidos não tratados. Estudos anteriores, abordando análises histológicas de tecidos do SNC dos animais com EAE mostraram frequentemente a presença de infiltrado celular inflamatório meningeal e no parênquima de cérebro e medula dos animais (PIAO et al., 2007; KROENKE et al., 2008; MATSUSHITA et al., 2008;

ZHANG et al., 2011). Como revisto por Goverman e colaboradores (2009) o espaço subaracnóide é considerado o local inicial para entrada de células no SNC em função da expressão constitutiva de receptores de quimiocinas o que favoreceria a entrada das células inflamatórias, justificando a presença de infiltrado celular inflamatório menigeal no SNC.

Os resultados obtidos demonstraram uma redução de infiltrado de células nos tecidos do SNC no tratamento com TDG ou genisteína, o que poderia justificar a redução dos sinais clínicos dos animais tratados com TDG. Além disso, os resultados apresentados neste estudo reafirmam a hipótese de que a piora nos sintomas clínicos da EAE estão correlacionados com o influxo de células no cérebro e medula, promovendo o aumento no perfil Th17 e Th1.

Portanto pode-se sugerir o TDG como uma possível terapia no tratamento da EAE e conseqüentemente, EM. Entretanto, estudos clínicos devem ser realizados para completar a avaliação desta substância e confirmar o seu potencial terapêutico na EM.

## 7 CONCLUSÃO

- Os derivados lipofílicos da genisteína, assim como a genisteína, não alteraram a viabilidade celular de macrófagos J774 A.1;
- Os derivados da genisteína inibiram a produção de NO e IL-12, mas não inibiram a produção de TNF- $\alpha$  *in vitro*.
- Com relação ao tratamento com TDG pode-se concluir que este derivado lipofílico da genisteína, é capaz de melhorar os sinais clínicos da EAE, com a redução na porcentagem de células CD4<sup>+</sup> produtoras de IL-17 e aumento da porcentagem de células Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, IL-10<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CTLA-4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> no cérebro dos animais dos animais.
- O tratamento com TDG reduziu a concentração de citocinas pró-inflamatórias (IL17, IL-6, IFN- $\gamma$ ) resultando em aumento de células Tregs e produção de IL-10 em cérebro e medula.
- TDG promoveu a redução de CCL20 em macerado de cérebro e medula.
- A análise histopatológica mostrou que o TDG reduziu o infiltrado celular inflamatório no SNC, assim como a genisteína.

Estes resultados da imunomodulação induzida pelo derivado lipofílico da genisteína TDG na EAE permitem concluir que esta substância possa ter um potencial terapêutico na EM.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADELMANN, M.; WOOD, J.; BENZEL, I.; FIORI, P.; LASSMANN, H.; MATTHIEU, J.M.; GARDINIER, M.V.; DORNMAIR, K.; LININGTON, C. The N-terminal domain of the myelin oligodendrocyte (MOG) induces acute demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis in the Lewis rat. **The Journal of Neuroimmunology**, v. 63, n. 1, p. 17-27, 1995.

AHARONI, R.; EILAM, R.; STOCK, A.; VAINSHTEIN, A.; SHEZEN, E., GAL, H., FRIEDMAN, N.; ARNON, R. Glatiramer acetate reduces Th-17 inflammation and induces regulatory T-cells in the CNS of mice with relapsing–remitting or chronic EAE. **Journal of Neuroimmunology**, v. 225, n. 1-2, p. 100–111, 2010.

AHARONI, R.; TEITELBAUM, D.; ARNON, R.; SELA, M. Copolymer 1 acts against the immunodominant epitope 82-100 of myelin basic protein by T cell receptor antagonism in addition to major histocompatibility complex blocking. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. , p. 634–639, 1999.

AKIYAMA, T.; ISHIDA, J.; NAKAGAWA, S.; OGAWARA, H.; WATANABE, S.; ITOH, N.; SHIBUYA, M.; FUKAMI, Y. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 12, p. 5592-5595, 1987.

ALEGRE, M.L.; FRAUWIRTH, K.A.; THOMPSON, C.B. T cell regulation by CD28 and CTLA-4. **Nature**, v. 1, n. 1, p. 220-228, 2001.

AXTELL, R. C.; JONG, B. A.; BONIFACE, K.; VOORT, L.F.V.; BHAT, R.; SARNO, P.; NAVE, R.; HAN, M.; ZHONG, F.; CASTELLANOS, J.G.; MAIR, R.; CHRISTAKOS, A.; KOLKOWITZ, I., KATZ, L.; KILLESTEIN, J.; POLMAN, C.H.; MALEFYT, R.W.; STEINMAN, L.; RAMAN, C. T helper type 1 and 17 cells determine efficacy of interferon- $\beta$  in multiple sclerosis and experimental encephalomyelitis. **Nature**, v. 16, n. 4, p. 406-413, 2010.

BADEAU, M.; TIKKANEN, M.J.; APPT, S.E.; ADLERCREUTZ, H.; CLARKSON, T.B.; HOIKKALA, A., WÄHÄLÄD, K.; MIKKOLA, T.S. Determination of plasma genistein fatty acid esters following administration of genistein or genistein 4 $\alpha$ -7-*o*-dioleate in monkeys. **Biochimica et Biophysica acta**, v. 1738, n. 1-3, p. 115 – 120, 2005.

BAR-OR, A.; CALABRESI, P.A. J.; ARNOLD, D.; MARKOWITZ, C.; SHAFER, S.; KASPER, L.H.; WAUBANT, E.; GAZDA, S.; FOX, R.J.; PANZARA, M.; SARKAR, N.; AGARWAL, S.; SMITH, C.H. Rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis: a 72-week, open-label, phase I trial. **Annals of Neurology**, v. 63, n. 3, p. 395-400, 2008.

BASSO, A.S; FRENKEL, D.; QUINTANA, F.J.; PINTO, F.A.C.; STOJKOVIC, S.P.; PUCKETT, L.; MONSONEGO, A.; SHIR, A.B.; ENGEL, Y.; GOZIN, M.; WEINER, H.L. Reversal of axonal loss and disability in a mouse model of progressive multiple sclerosis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 4, p. 1532-1543, 2008.

BEBO, B.F.; FYFE-JOHNSON, A.; ADLARD, K.; BEAM, A.G.; VANDENBARK, A.A.; OFFNER, H. Low-dose estrogen therapy ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in two different inbred mouse strains. **Journal of Immunology**, 166, n. 3, p. 2080–2089, 2001.

BERGHMANS, N.; NUYTS, A; UYTENHOVE, C.; SNICK, J.V.; OPDENAKKER, G.; HEREMANS, H. Interferon-g Orchestrates the Number and Function of Th17 Cells in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 31, n. 7, p. 575-587, 2011.

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

BEUTLER, E.; SIPE, J.C.; ROMINE, J.S.; KOZIOL, J.A.; MCMILLAN, R.; ZYROFF, J. The treatment of chronic progressive multiple sclerosis with cladribine. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 4, p. 1716-1720, 1996.

BIELEKOVA, B.; CATALFAMO, M.; REICHERT-SCRIVNER, S.; PACKER, A.; CERNA, M.; WALDMANN, T.A.; MCFARLAND, H.; HENKART, P.A.; MARTIN, R. Regulatory CD56<sup>bright</sup> natural killer cells mediate immunomodulatory effects of IL-2R $\alpha$ -targeted therapy (daclizumab) in multiple sclerosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 15, p. 5941-5946, 2006.

BLACON, Y.C.; FARIAS, A.S.; GOELNITZ, U.; LOPES, S.C.P.; ARRAIS-SILVA, W.W.; CARVALHO, B.O.et al. Hyperbaric oxygen prevents early death caused by experimental cerebral malária. **Plos One**, v. 3, n. 9, p. 3126, 2008.

BURGER, D.; MOLNARFI, N.; WEBER, M.S.; BRANDT, K.J.; BENKHOUCHA, M.; GRUAZ, L.; CHOFFLON, M.; ZAMVIL, S.S.; LALIVE, P.H. Glatiramer acetate increases IL-1 receptor antagonist but decreases T cell-induced IL-1 $\beta$  in human monocytes and multiple sclerosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 11, p. 4355-4359, 2009.

CAVE, N.J.; BACKUS, R.C.; MARKS, S.L.; KLASING, K.C. The bioavailability and disposition kinetics of genistein in cats. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 30, n. 4, p. 327-335, 2007.

CHEN, J.; LIN, H., HU, M. Metabolism of flavonoids via enteric recycling: role of intestinal disposition. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 304, n. 3, p.1228-1235, 2003.

CHEN, W.; JIN, W.; HARDEGEN, N.; LEI, K.; LI, L.; MARINOS, N. Conversion of peripheral CD4+CD25- naïve T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF- $\beta$  induction of transcription factor Foxp3. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 198, n. 12, p. 1875-1886, 2003.

COLES, A.J.; WING, M.G.; MOLYNEUX, P.; PAOLILLO, A.; DAVIE, C.M.; HALE, G., MILLER, D; WALDMANN, H; COMPSTON, A. Monoclonal antibody treatment exposes three mechanisms underlying the clinical course of multiple sclerosis. **Annals of Neurology**, v. 46, n. 3, p. 296-304, 1999.

COMALADA, M.; BALLESTER, I.; BAILÓN, E.; SIERRA, S.; XAUS, J.; GÁLVEZ, J.; MEDINA, F.S.; ZARZUELO, A. Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: Analysis of the structure-activity relationship. **Biochemical Pharmacology**, v. 72, n. 8, p. 1010-1021, 2006.

CUA, D; HUTCHINS, B; LAFACE, DM; STOHLMAN, SA; COFFMAN, RL. Central Nervous System Expression of IL-10 Inhibits Autoimmune Encephalomyelitis. **Journal of Immunology**, v. 166, n 1; p. 602-608, 2001.

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

DIJSSELBLOEM, N.; GORIELY, S.; ALBARANI, V.; GERLO, S.; FRANCOZ, S.; MARINE, J.C.; GOLDMAN, M. HAEGEMAN, G. A. Critical Role for p53 in the control of NF- $\kappa$ B-dependent gene expression in TLR-4-stimulated dendritic cells exposed to genistein. **Journal of Immunology**, v. 178, n. 8, p. 5048-5057, 2007.

DONZELLI, A.; BRAIDA, D.; FINARDI, A.; CAPURRO, V.; VALSECCHI, A.E.; COLLEONI, M.; SALA, M. Neuroprotective Effects of Genistein in Mongolian Gerbils: Estrogen Receptor- $\beta$  Involvement. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 114, n. 2, p. 158-167, 2010.

ELICES, M.J.; OSBORN, L.; TAKADA, Y.; CROUSE, C.; LUHOWSKYJ, S.; HEMLER, M.E.; LOBB, R.R. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. **Cell**, v. 60, n. 4, p. 577- 584, 1990.

ELLOSO, M.M.; PHIEL, K.; HENDERSON, R.A.; HARRIS, H.A.; ADELMAN, S.J. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis using estrogen receptor-selective ligands. **Journal of Endocrinology**, v. 185, n. 2, p. 243–244, 2005.

ERCOLINI, A.M.; MILLER, S.D. Mechanisms of immunopathology in murine models of central nervous system demyelinating disease. **Journal of Immunology**, v. 176, n. 6, p. 3293-3298, 2006.

EVRON, S., BRENNER, T.; ABRAMSKY, O. Suppressive effect of pregnancy on the development of experimental allergic encephalomyelitis in rabbits. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 5, n. 3, p. 109–113, 1984.

FARINA, C., WEBER, M.S., MEINL, E., WEKERLE, H., HOHLFELD, R. Glatiramer acetate in multiple sclerosis: update on potential mechanisms of action. **The Lancet Neurology**, v. 4, n. 9, p. 567–575, 2005.

FLORIS, S.; BLEZER, ELA; SCHREIBELT, G.; DOPP, E.; VAN DER POL SMA, SCHADEE-EESTERMANS, IL. Blood-brain barrier permeability and monocyte infiltration in experimental allergic encephalomyelitis: a quantitative MRI study. **Brain**, v. 127, n.3, p. 616-627, 2004.

FLÜGEL, A.; BERKOWICZ, T; RITTER, T.; LABEUR, M.; JENNE, D.G.; LI, Z.; ELLWART, J.W.; WILLEM, M.; LASSMANN, H.; WEKERLE, H. 2001. Migratory activity and functional changes of green fluorescent effector T cells before and during experimental autoimmune encephalomyelitis. **Immunity**, v. 14, n. 5, p. 547–560, 2001.

FOX, E. J. Mechanism of action of mitoxantrone. **Neurology**, Round Rock, v. 63, n. 12, p. 15-18, 2004.

FRIDKIS-HARELI, M.; TEITELBAUM, D.; GUREVICH, E.; PECHT, I.; BRAUTBAR, C.; KWON, O.J.; BRENNER, T.; ARNON, R.; SELA, M. Direct binding of myelin basic protein and synthetic copolymer 1 class II major histocompatibility complex molecules on living antigen presenting cells-specificity and promiscuity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 11, p. 4872-4876, 1994.

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

GADGEEL, S.M.; ALI, S.; PHILIP, P.A.; WOZNIAK, A.; SARKAR, F.H. Genistein enhances the effect of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors and inhibits nuclear factor kappa B in nonsmall cell lung cancer cell lines. **Cancer**, v. 115, n. 10, p. 2165-2176, 2009.

GARAY, L.; DENISELLE, M.C.G.; MEYER, M.; COSTA, J.J.L.; LIMA, A.; ROIG, P.; DENICOLA, A.F. Protective effects of progesterone administration on axonal pathology in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. **Brain Research**, v. 1283, p. 177-185, 2009.

GARAY, L.; GONZALEZ DENISELLE, M.C.; GIERMAN, L.; MEYER, M.; LIMA, A.; ROIG, P.; DE NICOLA, A.F. Steroid protection in the experimental autoimmune encephalomyelitis model of multiple sclerosis. **Neuroimmunomodulation**, v. 15, n. 1, p. 76-83, 2008.

GIRAUD, S.N.; CARON, C.M.; PHAM-DINH, D.; KITABGI, P.; NICOT, A.B. Estradiol inhibits ongoing autoimmune neuroinflammation and NFκB-dependent CCL2 expression in reactive astrocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 18, p. 8416-8421, 2010.

GOTOH, T.; YAMADA, K.; YIN, H.; ITO, A.; KATAOKA, T.; DOHI, K. Chemoprevention of *N*-Nitroso-*N*-methylurea-induced Rat Mammary Carcinogenesis by Soy Foods or Biochanin A. **Cancer Science**, v. 89, n. 2, p. 137-142, 1998.

GOVERMAN, J. Autoimmune T cell response in the central nervous system. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 6, p. 393-407, 2009.

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

HÄMÄLÄINEN, M.; NIEMINEN, R.; VUORELA, P.; HEINONEN, M.; MOILANEN, E. Anti-Inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF-kappaB activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF-kappaB activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. **Mediators of Inflammation**, v. 2007, ID 45673, p.10, 2007.

HAMBLETON, J.; WEINSTEIN, S.L.; LEM, L.; DE FRANCO, A.L. Activation of c- Jun N-terminal kinase in bacterial lipopolysaccharide-stimulated macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 7, p. 2774-2778, 1996.

HEDEGAARD, C.J.; KRAKAUER, M.; BENDTZEN, K.; LUND, H.; SELLEBJERG, F.; NIELSEN, C.H. T helper cell type 1 (Th1), Th2 and Th17 responses to myelin basic protein and disease activity in multiple sclerosis. **Immunology**, v. 125, n. 2, p.161-169, 2008.

HENDRIKS, J.J.; ALBLAS, J.; VAN DER POL, S.M.; VAN TOL, E.A.; DIJKSTRA, C.D.; DE VRIES, H.E. Flavonoids influence monocytic GTPase activity and are protective in experimental allergic encephalitis. **The Journal Experimental Medicine**, v. 200, n. 12, p. 1667-72, 2004.

HO, L.; CHANG, D.M.; SHIAU, H.Y.; CHEN, C.H.; HSIEH, T.Y.; HSU, Y.L.; WONG, C.S.; LAI, J.H. Aspirin differentially regulates endotoxin-induced IL-12 and TNF- $\alpha$  production in human dendritic cells Scand. **J Rheumatol**, v. 30, n. 6, p. 346-352, 2001.

HOFSTETTER, H.H.; IBRAHIM, S.M.; KOCZAN, D.; KRUSE, N.; WEISHAUPT, A.; TOYKA, K.V.; GOLD, R. Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. **Cellular Immunology**, v. 237, n. 2, p. 123-130, 2005.

HOU, W.; WU, Y.; SUN, S.; SHI, M.; SUN, Y.; YANG, C.; PEI, G.; GU, Y.; ZHONG, C.; SUN, B. Pertussis Toxin Enhances Th1 Responses by Stimulation of Dendritic Cells. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 4, p. 1728-1736, 2003.

HUPPERT, J.; CLOSHEN, D.; CROXFORD, A.; WHITE, R.; KULING, P.; PIETROWSKI, E.; BECHMANN, I.; BECHER, B.; LUHMANN, H.J.; WAISMAN, A.; KUHLMANN, C.R.W. Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. **The FASEB Journal**, v. 24, n. 4, p. 1023-1034, 2010.

HURWITZ, A.A.; SULLIVAN, T.J.; SOBEL, R.A.; ALLISON, J.P. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) limits the expansion of encephalitogenic T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)-resistant BALB/c mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 5, p. 3013-3017, 2002.

JUEDES, A.E.; HJELMSTRÖM, P.; BERGMAN, C.M.; NEILD, A.L.; RUDDLE, N.H. Kinetics and cellular origin of cytokines in the central nervous system: insight into mechanisms of myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced experimental autoimmune Encephalomyelitis. **Journal of Immunology**, v. 164, n. 1, p. 419-426, 2000.

JONES, J.L.; COLES, A. New treatment strategies in multiple sclerosis. **Experimental Neurology**, v. 225, n.1, p.34-39, 2010.

KANG, Z.; ALTUNTAS, C.Z.; GULEN, M.F.; LIU, C.; GILTIAY, N.; QIN, H.; LIU, L.; QIAN, W.; RANSOHOFF, R.M.; BERGMANN, C.; STOHLMAN, S.; TUOHY, V.K.; LI, X. Astrocyte-Restricted Ablation of Interleukin-17-Induced Act1-Mediated Signaling Ameliorates Autoimmune Encephalomyelitis. **Immunity**, v. 32, n. 3, p. 414-425, 2010.

KAWAKAMI, N.; LASSMANN, S.; LI, Z.; ODOARDI, F.; RITTER, T.; ZIEMSEN, T.; KLINKERT, W.E.; ELLWART, J.W.; BRADL, M.; KRIVACIC, K.; LASSMANN, H.; RANSOHOFF, R.M.; VOLK, H.D.; WEKERLE, H.; LININGTON, C.; FLÜGEL, A. The activation status of neuroantigen-specific T cells in the target organ determines the clinical outcome of autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Experimental Medicine**, v.199, n. 5, p. 185–197, 2004.

KIM, H. J.; IFERGAN, I.; ANTEL, J. P.; SEGUIN, R.; DUDDY, M.; LAPIERRE, Y.; JALILI, F.; BAR-OR, A. Type 2 Monocyte and Microglia Differentiation Mediated by Glatiramer Acetate Therapy in Patients with Multiple . **Journal of Immunology**, v. 172, n. 11, p. 7144-7153, 2004.

KIVISÄKK, P.; IMITOLA, J.; RASMUSSEN, S.; ELYAMAN, W., ZHU, B.; RANSOHOFF, R. M.; KHOURY, S.J. Localizing central nervous system immune surveillance: Meningeal antigen-presenting cells activate T cells during experimental autoimmune encephalomyelitis. **Annals of Neurology**, v. 65, n. 4, p. 457-469 2009.

KOHN, AP; CARPENTIER, PA; ANGER, HA; MILLER, SD. Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune response and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Immunology**, vol. 169, n. 9, p. 4712-4716, 2002.

KOMIYAMA, Y.; NAKAE, S.; MATSUKI, T.; NAMBU, A.; ISHIGAME, H.; KAKUTA, S. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Immunology**, v. 177, n. 1, p. 566–573, 2006.

KROENKE, M.A.; CARLSON, T.J.; ANDJELKOVIC, A.V.; SEGAL, B.M. 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**, v. 205, n. 7, p. 1535-1541, 2008.

KUIPER, G.G.J.M.; GUSTAFSSON, J. The novel estrogen receptor- $\beta$  subtype: potential role in the cell- and promoter-specific actions of estrogens and anti-estrogens. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 410, n. 1, p. 87-90, 1997.

LANG, H.L.; JACOBSEN, H.; IKEMIZU, S.; ANDERSSON, C.; HARLOS, K.; MADSEN, L.; HJORTH, P.; SONDERGAARD, L.; SVEJGAARD, A.; WICHERPFENNIG, K.; STUART, D.I.; JOHN, I. B.; JONES, E.Y.; FUGGER, L. A functional and structural basis for TCR cross-reactivity in multiple sclerosis. **Nature Immunology**, v.3, p. 940-943, 2002.

LAURENCE, A., O'SHEA, J.J. T<sub>H</sub>17 differentiation: of mice and men. **Nature Immunology**, v. 8,n. 9, p. 903-905, 2007.

LEES, J. R., GOLUMBEK, P. T., SIM, J., DORSEY, D.; RUSSELL, J. H. Regional CNS responses to IFN- $\gamma$  determine lesion localization patterns during EAE pathogenesis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 11, p. 2633–2642, 2008.



LEWIS, P.T.; WÄHÄLÄ, K.; HOIKKALA, A., MUTIKAINEN, I.; MENG, Q.H.; ADLERCREUTZ, H.; TIKKANEN, M.J. Synthesis of antioxidant isoflavone fatty acid esters. **Tetrahedron**, v. 56, p. 7805-7810, 2000.

LININGTON, C.; BERGER, T.; PERRY, L.; WEERTH, S.; HINZE-SELCH, D.; ZHANG, Y.; LU, H.C.; LASSMANN, H.; WEKERLE, H. T cells specific for the myelin oligodendrocyte glycoprotein mediate an unusual autoimmune inflammatory response in the central nervous system. **European Journal of Immunology**, v. 23, n. 6, p. 1364–1372, 1993.

LIU, M.K.; HERRERA-VELIT, P.; BROWNSEY, R.W.; REINER, N.E. CD14-dependent activation of protein kinase C and mitogen-activated protein kinases (p42 and p44) in human monocytes treated with bacterial lipopolysaccharide. **Journal of Immunology**, v. 153, n. 6, p. 2642-2652, 1994.

LUBLIN, F. D. The incomplete nature of multiple sclerosis relapse resolution. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 256, n. 1-2, suppl. 14-18, 2007.

MANGAN, P.R.; HARRINGTON, L.E.; QUINN, D.B.; HELMS, W.S.; BULLARD, D.C.; ELSON, C.O., et al. Transforming growth factor- $\beta$  induces development of the Th17 lineage. **Nature**, v. 441, n. 7090, p. 231-234, 2006.

MARCONDES, M.C.; FURTADO, G.C.; WENSKY, A.; LAFAILLE, M. A. C.; FOX, H.S.; LAFAILLE, J.J. Immune Regulatory Mechanisms Influence Early Pathology in Spinal Cord Injury and in Spontaneous Autoimmune Encephalomyelitis. **American Journal of Pathology**, v. 166, n. 6, p. 1749-1760, 2005.

MATSUSHITA, T.; YANABA, K.; BOUAZIZ, J.D.; FUJIMOTO, M.; TEDDER, T. F. Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 10, p. 3420-3430, 2008.

MARKAR, T.K.; TRISLER, D.; BEVER, C.T.; GOOLSBY, J.E.; SURA, K.T.; BALASUBRAMANIAN, S.; SULTANA, S.; PATEL, N.; FORD, D.; SINGH, I.S.; GUPTA, A.; VALENZUELA, R.M.; DHIB-JALBUT, S. Stem cell based delivery of IFN-beta reduces relapses in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal Neuroimmunology**, v. 196, n. 1-2, p. 67-81, 2008.

MARTIN-SAAVEDRA, F.M.; GONZALEZ-GARCIA, C.; BRAVO, B.; BALLESTER, S. Beta interferon restricts the inflammatory potential of CD4<sup>+</sup> cells through the boost of the Th2 phenotype, the inhibition of Th17 response and the prevalence of naturally occurring T regulatory cells. **Molecular Immunology**, v. 45, n. 15, p. 4008-4019, 2008.

MENG, Q.H.; LEWIS, B.P.; WÄHÄLÄ, K.; ADLERCREUTZ, H.; TIKKANEN, M.J. Incorporation of esterified soybean isoflavones with antioxidant activity into low density lipoprotein. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1438, n. 3, p. 369-376, 1999.

MIOSSEC, P. Diseases that may benefit from manipulating the Th17 pathway. **European Journal of Immunology**, v. 39, n. 3, p. 667-669, 2009.

MOLL, F.; KATSAROS, D.; LAZENNEC, G.; HELLIO, N.; ROGER, P.; GIACOLONE, P.L.; CHALBOS, D.; MAUDELONDE, T.; ROCHEFORT, H.; PUJOL, P. Estrogen induction and overexpression of fibulin-1C mRNA in ovarian cancer cells. **Oncogene**, v. 21, n. 7, p. 1097-1107, 2002.

MONTENEGRO, M.F.; PESSA, L.R.; TANUS-SANTOS, J.E. Isoflavone genistein inhibits the angiotensin-converting enzyme and alters the vascular responses to angiotensin I and bradykinin. **European Journal of Pharmacology**, v. 607, n. 1-3, p. 173-177, 2009.

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

NEUHAUS, O.; ARCHELOS, J.J.; HARTUNG, H.P. Immunomodulation in multiple sclerosis: from immunosuppression to neuroprotection. **Trends in Pharmacological Science**, v. 24, n. 3, p. 131-138, 2003.

OKSENBURG, J.R.; J.R.; BARANZINI, S. E., SAWCER, S.; HAUSER, S. L. The genetics of multiple sclerosis: SNPs to pathways to pathogenesis. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, p. 516-523, 2008.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Atlas Multiple Sclerosis. Resources in the World. World Health Organization, p. 1-54, 2008.

PARK, H.; LI, Z.; YANG, X.O.; CHANG, S.H.; NURIEVA, R.; WANG, Y.H.; WANG, Y.; HOOD, L.; ZHU, Z.; TIAN, Q.; DONG, C. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. **Nature Immunology**, v. 6, n. 11, p. 1133-1141, 2005.

PETERSON, L.K.; FUJINAMI, R.S. Inflammation, demyelination, neurodegeneration and neuroprotection in the pathogenesis of multiple sclerosis. **Journal of Immunology**, v. 184, n. 1-2, p. 37-44, 2007.

PETRO, T.M. Regulatory role of resveratrol on Th17 in autoimmune disease. **International Immunopharmacology**, v. 11, n. 3, p.310-318, 2011.

PIAO, W.H.; WONG, R.; BAI, X. F.; HUANG, J.; CAMPAGNOLO, D.I. ; DORR, R.T. ; VOLLMER T. L., SHI, F. D. Therapeutic effect of anthracene-based anticancer agent ethonafide in an animal model of multiple sclerosis. **Journal of Immunology**, v. 179, n. 1, p. 7415-7423, 2007.

POLKOWSKI, K.; POPIOLKIEWICZ, J.; KRZECZYNSKI, P.; RAMZA, J.; PUCKO, W; ZEGROCKA-STENDEL, O.; BORYSKI, J. ; SKIERSKI, J.S.; MAZUREK, A.P.; GRYNKIEWICZ, G. Cytostatic and cytotoxic activity of synthetic genistein glycosides against human cancer cell lines. **Cancer Letters**, v. 203, n. 1, p. 59-69, 2004.

QUINTANA, F.J.; WEINER, H.L. Environmental control of Th17 differentiation. **European Journal of Immunology**, v. 39,n. 3, p. 655-657, 2009.

REBOLDI, A.; COISNE, C.; DIRK B.; D.; BENVENUTO, F.; BOTTINELLI, D.; LIRA, S.; UCCELLI, A.; LANZAVECCHIA, A.; ENGELHARDT, B; SALLUSTO, F. 2009. C-C chemokine receptor 6–regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. **Nature Immunology**, v. 10, n. 5, p.514-523, 2009.

RENNO, T.; KRAKOWSKI, M.; PICCIRILLO, C.; LIN, J.Y.; OWENS, T. TNF-  $\alpha$  expression by resident microglia and infiltrating leukocytes in the central nervous system of mice with experimental allergic encephalomyelitis: regulation by Th1 cytokines. **Journal of Immunology**, v. 154, n. 2, p. 944-953, 1995.

ROGERS, J.; PERKINS, I.; OLPHEN, A.V.; BURDASH, N.; KLEIN, T. W.; FRIEDMAN, H. Epigallocatechin Gallate Modulates cytokine production by bone marrow derived dendritic cells stimulated with lipopolysaccharide or Muramyl dipeptide, or infected with Legionella pneumophila. **Experimental Biology and Medicine**, v. 230, p.645-651, 2005.

SAWICKA, E.; DUBOIS, G.; JARAI, G.; EDWARDS, M.; THOMAS, M.; NICHOLLS, A.; ALBERT, R.; NEWSON, C.; BRINKMANN, V.; WALKER, C. The sphingosine 1-phosphate receptor agonist FTY720 differentially affects the sequestration of CD4+/CD25+ T-regulatory cells and enhances their functional activity. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 12, p. 7973-7980, 2005.

SETCHELL, K.D.R.; BROWN, N.M.; ZIMMER-NECHEMIAS, L.; BRASHEAR, W. T.; WOLFE, B.E., KIRSCHNER, A.S., HEUBI, J.E. Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, n. 2, p. 447-453, 2002.

SETCHELL, K.D.R.; BRZEZINSKI, A., BROWN, N.M.; DESAI, P.B.; MELHEM, M.; MEREDITH, T.; LINDA, Z.N.; BRIAN, W.; YORAM, C.; YOAV, B. Pharmacokinetics of a slow-release formulation of soybean isoflavones in healthy postmenopausal women. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1938-1944, 2005.

SETCHELL, K.D.R. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, n. 6, p. 1333S-1346S, 1998.

SHELNUTT, S.R.; CIMINO, C.O.; WIGGINS, P.A.; RONIS, M.J.J. ; BADGER, T. M. Pharmacokinetics of the glucuronide and sulfate conjugates of genistein and daidzein in men and women after consumption of a soy beverage. **American Society for Clinical Nutrition**, v. 76, n. 3, p. 588-594, 2002.

SHIVE, C.L.; HOFSTETTER, H; ARREDONDO, L.; SHAW, C.; FORSTHUBER, T.G. The enhanced antigen-specific production of cytokines induced by pertussis toxin is due to clonal expansion of T cells and not to altered effector functions of long-term memory cells. **European Journal of Immunology**, v. 30, n. 8, p. 2422-2431, 2000.

SONG, L.; YAN, H.; CAI, D. Protective Effects of Soybean Isoflavone against Gamma-Irradiation Induced Damages in Mice. **Journal of Radiation Research**, v. 47, n. 2, p. 157-165, 2006.

SORENSEN, 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. Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. **Journal Clinical Investigation**, Cleveland, v. 103, n. 6, p.807–815, 1999.

SOSPEDRA, M.; MARTIN, R. Immunology of Multiple Sclerosis. **Annual Reviews of Immunology**, v. 23, p. 683-747, 2005.

SOUCY, N.V.; PARKINSON, D.H.; SOCHASKI, M.A.; BORGHOFF, S.J. Kinetics of genistein and its conjugated metabolites in pregnant sprague-dawley rats following single and repeated genistein administration. **Toxicological Sciences**, v. 90, n. 1, p. 230-240, 2006.

SPACH, K.M.; NASHOLD, F.E.; DITTEL, B.N.; HAYES, C.E. IL-10 Signaling is essential for 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-mediated inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Immunology**, v. 177, n. 9, p. 6030-6037, 2006.

SWEET, M.J.; HUME, D.A. Endotoxin signal transduction in macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 60, n. 1, p. 8 -26, 1996.

THAM, D.M.; GARDNER, C.D.; HASKELL, W.L. Potential Health Benefits of Dietary Phytoestrogens: A Review of the Clinical, Epidemiological, and Mechanistic Evidence. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 83, n. 7, p. 2223-2235, 1998.

WEBER, M.S.; PROD'HOMME, T.; YOUSSEF, S.; DUNN, S.E.; RUNDLE, C.D.; LEE, L.; PATARROYO, J.C.; STÜVE, O.; SOBEL, R.A.; STEINMAN, L.; ZAMVIL, S.S.; 2007. Type ii monocytes modulate t cell-mediated central nervous system autoimmune disease. **Nature Medicine**, v. 13, n. 8, p. 935–943, 2007.

WENSKY, A.K.; FURTADO, G.C.; MARCONDES, M.C.G.; CHEN, S.; MANFRA, D.; LIRA, S. A.; ZAGZAG, D.; LAFAILLE, J.J. 2005. IFN- $\gamma$  Determines Distinct Clinical Outcomes in Autoimmune Encephalomyelitis. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 3, p. 1416-1423, 2005.

WING, K.; ONISHI, Y.; PRIETRO-MARTIN, P.; YAMAGUCHI, T.; MIYARA, M.; FEHERVARI, Z. et al. CTLA-4 Control over Foxp3<sup>+</sup>Regulatory T cell function. **Science**, v. 322, n. 5899, p. 271-275, 2008.

WUCHERPFENNIG, K. W.; STROMINGER, J. L. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. **Cell**, v. 80, n. 5, p. 695–705, 1995.

YAMAKOSHI, J.; PISKULA, M.K.; IZUMI, T.; TOBE, K.; SAITO, M.; KATAOKA, S.; OBATA, A.; KIKUCHI, M. Isoflavone Aglycone–Rich Extract without Soy Protein Attenuates Atherosclerosis Development in Cholesterol-Fed Rabbits. **Journal of Nutrition**, v. 130, n. 8, p. 1887-1893, 2000.

YEN, J.H.; KONG, W.; GANEA, D. Interferon beta inhibits dendritic cell migration through STAT-1 mediated transcriptional suppression of CCR7 and metalloproteinase 9. **Journal of Immunology**, v. 184, n.7, p. 3478-3486, 2010.

YIN, J.X; TU, J.L.; LIN, H.J.; SHI, F.D.; LIU, R.L.; ZHAO, C.B.; STEPHEN, W.C.; KUNIYOSHI, S.; SHI, J. Centrally administered pertussis toxin inhibits microglia migration to the spinal cord and prevents dissemination of disease in an EAE mouse model. **PLoS ONE**, v. 5, n. 8, E 12400, p. 1-14, 2010.

ZELANTE, T.; DE LUCA, A.; BONIFAZI, P.; MONTAGNOLI, C.; BOZZA, S.; MORETTI, S.; BELLADONNA, M.L.; VACCA, C.; CONTE, C.; MOSCI, P.; BISTONI, F.; PUCCHETTI, P.; KASTELEIN, R.A.; KOPF, M.; ROMANI, L. IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance. **European Journal of Immunology**, v. 37, n. 10, p. 2695-2706, 2007.

ZHANG, R.; TIAN, A.; ZHANG, H.; ZHOU, Z.; YU, H.; CHEN, L. Amelioration of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by  $\beta$ -elemene Treatment is Associated with Th17 and Treg Cell Balance. **Journal Molecular Neuroscience**, v. 44, n. 1, p. 31–40, 2011.

ZHOU, L.; IVANOV II; SPOLSKI, R.; MIN, R.; SHENDEROV, K; EGAWA, T., et al. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. **Nature Immunology**, v. 8, n. 9, p. 67-74, 2007.

## ANEXO I

## ANEXO II