

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Marcilene Gomes Evangelista

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE INATA NO DESENVOLVIMENTO
DO MODELO DE ENCEFALOMIELITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL
(EAE)**

Juiz de Fora

2013

MARCILENE GOMES EVANGELISTA

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE INATA NO DESENVOLVIMENTO
DO MODELO DE ENCEFALOMIELEITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL
(EAE)**

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

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Ferreira

Juiz de Fora

2013

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

Evangelista, Marcilene Gomes.

Avaliação da Resposta Imune Inata no Desenvolvimento do Modelo de Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE) / Marcilene Gomes Evangelista. -- 2013.

92 f. : il.

Orientadora: Ana Paula Ferreira

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2013.

1. Esclerose Múltipla. 2. EAE. 3. Imunidade Inata. 4. Receptor Toll-like. 5. Citocinas pró e anti-inflamatórias. I. Ferreira, Ana Paula, orient. II. Título.

MARCILENE GOMES EVANGELISTA

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE INATA NO DESENVOLVIMENTO
DO MODELO DE ENCEFALOMIELITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL
(EAE)**

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

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

Profa. Dra. Ana Cristina Gomes Santos, Laboratório de Imunobiologia, Universidade Federal de Minas Gerais.

Prof. Dr. Caio Cesar de Souza Alves, IMUNOCET, Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Universidade Federal de Juiz de Fora.

**À memória de Jésus Evangelista,
exemplo de caráter, decência,
dignidade e simplicidade.
O maior homem que já conheci e,
o melhor pai que alguém poderia ter.**

AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, pelo suporte financeiro que possibilitou a realização deste estudo.

A Deus, por cada detalhe trabalhado em minha vida, por ter iluminado o meu caminho durante todos estes anos e, ter me oferecido a oportunidade de viver, evoluir, crescer e conhecer todas as pessoas que citarei abaixo.

Aos meus pais, Jésus (*in memoriam*) e Ivone, por tudo que fizeram em minha vida, especialmente quanto à minha formação.

A minha querida irmã Márcia, e aos meus sobrinhos, Fellipe e Lorena, por torcerem por mim e compreenderem minha ausência em certos momentos e, principalmente, pelo estímulo, contribuindo em mais esta etapa de minha vida.

Ao Rodrigo, grande incentivador e companheiro, que me apoiou em todos os momentos, não me deixando jamais desistir.

À minha orientadora Profa. Dra. Ana Paula Ferreira, por ter acreditado em mim e na possibilidade de execução deste trabalho e, principalmente, pelos grandes ensinamentos que me proporcionou.

Ao Prof. Dr. Henrique Couto Teixeira, pelos ensinamentos.

Às Profas. Dra. Jacy Gameiro e Dra. Alice Belleigolli Rezende, por se disponibilizarem a contribuir ao presente estudo.

Ao Prof. Dr. Gilson Costa Macedo, pelos ensinamentos e por estar sempre presente com uma palavra incentivadora e alegre.

A todos os amigos e colegas do Laboratório de Imunologia do ICB, pelo convívio e por me acolherem com tanto carinho e, em especial, à Patrícia, uma grande incentivadora.

Aos amigos Sandra, Alyria e Caio Cesar, com os quais dividi muitas horas de trabalho. Compartilhamos momentos de ansiedade, cansaço e realizações. Muito obrigada pelas palavras e atitude de incentivo. Gostaria de fazer um agradecimento especial à Sandra, exemplo de ser humano e profissionalismo, sempre disposta a ajudar. Sua colaboração foi indispensável para a execução desta dissertação.

Aos alunos de iniciação científica que contribuíram com profissionalismo e responsabilidade. Em especial, ao Luan, um amigo de todas as horas e, ao Erick, pelo carinho e paciência nos “ensinamentos estatísticos”.

Aos amigos que, mesmo distantes, me acompanham, me incentivam e torcem por mim. Em especial ao Márcio, por ter sido o responsável pelo início desta caminhada. À Cláudia e à Valesca, por estarem sempre ao meu lado. Obrigada a todos pelo carinho e paciência nos momentos mais difíceis.

À dona Célia Regina, uma pessoa iluminada, sempre presente com uma palavra amiga e incentivadora.

E a todos que de alguma maneira me ajudaram a concluir este trabalho e me deram o incentivo para leva-lo adiante.

RESUMO

A esclerose múltipla (EM) é uma doença inflamatória, crônica e desmielinizante do sistema nervoso central (SNC). É na maioria dos casos grave e incapacitante, afetando cerca de 2,5 milhões de pessoas em todo mundo. Encefalomielite autoimune experimental (EAE) é um modelo murino de doença autoimune, mediada por linfócitos Th1 e Th17, desenvolvido para o estudo da EM. O protocolo de indução do modelo utiliza o adjuvante completo de Freund (CFA) que contém padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) que se ligam aos receptores Toll-like (TLRs), expressos em células apresentadoras de antígeno (APC), cruciais para ativação dos linfócitos T. Estes receptores são necessários à indução da EAE, ativando vias de sinalização nas células da imunidade inata e adaptativa, que podem induzir a produção de mediadores pró-inflamatórios, responsáveis pela lesão no SNC, ou mediadores anti-inflamatórios, que podem participar da regulação da doença. O presente estudo avaliou a resposta imune inata na fase inicial de desenvolvimento da EAE em camundongos C57BL/6 imunizados com o peptídeo MOG₃₅₋₅₅ (glicoproteína mielínica de oligodendrócitos) e CFA (grupo EAE) ou somente CFA (grupo MOG negativo). Os animais foram sacrificados nos dias 2, 4 e 7 após a indução do modelo. Os linfonodos inguinais e a medula espinhal foram removidos e submetidos à análise histológica, dosagens de citocinas e quimiocinas, assim como avaliação da expressão dos TLRs. Os resultados obtidos indicaram que somente os animais do grupo EAE desenvolveram sinais clínicos da doença. Este grupo também apresentou intenso infiltrado celular na medula espinhal no 7º dia após a indução, níveis elevados de quimiocinas CCL5 e CCL20 e citocinas IL-6, IL-12, IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-17, IL-10 e TGF- β no SNC, além de maior número de APCs expressando TLR3, TLR4 e TLR9. Desta forma, estes dados sugerem que a expressão dos TLRs e a produção das citocinas pró-inflamatórias mostram-se como sendo fatores críticos para a indução da EAE e, o aumento de padrões anti-inflamatórios, ainda nos pontos iniciais do desenvolvimento da doença, sugere o uso destes padrões, como mecanismos de regulação do modelo experimental e, possivelmente da EM.

Palavras chaves: esclerose múltipla, EAE, imunidade inata, APC, receptor Toll-like, citocinas pró e anti-inflamatórias, quimiocinas.

ABSTRACT

Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory, chronic demyelinating disease of the central nervous system (CNS). It is in most cases severe and disabling, affecting about 2.5 million people worldwide. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is a murine model of autoimmune disease mediated by Th1 and Th17 lymphocytes developed for studying MS. The induction protocol model uses the complete Freund's adjuvant (CFA) containing the pathogen associated molecular patterns (PAMPs) that bind to Toll-like receptors (TLRs) expressed on antigen presenting cells (APC), crucial for activation T lymphocytes. These receptors are necessary for the induction of EAE by activating signal pathways in cells of the innate and adaptive immunity, which can induce the production of pro-inflammatory mediators responsible for the CNS lesions or anti-inflammatory mediators that can participate in the regulation of disease. The present study evaluated the innate immune response in the initial phase of development of EAE in C57BL/6 mice immunized with MOG₃₅₋₅₅ peptide (myelin oligodendrocyte glycoprotein) and CFA (group EAE) or CFA alone (group MOG negative). The animals were sacrificed on days 2, 4 and 7 after induction model. The inguinal lymph nodes and spinal cord were removed and subjected to histological, serum cytokines and chemokines, as well as evaluating the expression of TLRs. The results showed that only animals of group EAE developed clinical signs of disease. This group also showed an intense cellular infiltrate in the spinal cord on day 7 after induction, high levels of chemokines CCL5 and CCL20 and cytokines IL-6, IL-12, IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-17, IL-10 and TGF- β in the CNS, and increased number of APCs expressing TLR3, TLR4 and TLR9. Thus, these data suggest that expression of TLRs and production of pro-inflammatory cytokines are shown as being critical for the induction of EAE, and increased anti-inflammatory patterns, still in the initial points of development of the disease, suggests the use of these patterns as regulation mechanisms of the experimental model and possibly the MS.

Keywords: multiple sclerosis, EAE, innate immunity, APC, Toll-like receptor, cytokines pro-and anti-inflammatory, chemokines.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1	Padrões clínicos da Esclerose Múltipla.....	24
Figura 2	Distribuição mundial da prevalência de EM segundo Organização Mundial de Saúde (OMS).....	26
Figura 3	Vias da imunidade inata contra as infecções.....	29
Figura 4	O papel do sistema imune inato na EAE.....	30
Figura 5	Os receptores envolvidos na co-atuação do sistema imune inato e adaptativo.....	31
Figura 6	Representação esquemática do processo autoimune na EAE.....	33
Figura 7	Diagrama esquemático do papel de cada população de macrófagos na EAE.....	34
Figura 8	Os receptores Toll-like (TLRs) e seus ligantes.....	36
Figura 9	Representação esquemática do delineamento Experimental.....	42
Figura 10	Média do escore clínico e massa corporal dos animais estudados.....	49
Figura 11	Número absoluto de células MHCII ⁺ F4/80 ⁺ CD11c ⁺ expressando TLR3, TLR4 e TLR9 determinada por citometria de fluxo de células mononucleares isoladas dos linfonodos inguinais nos grupos dos animais estudados.....	50

Figura 12	Número absoluto de células MHCII ⁺ F4/80 ⁺ CD11c ⁺ expressando TLR3, TLR4 e TLR9 determinada por citometria de fluxo de células mononucleares isoladas da medula espinhal nos grupos dos animais estudados.....	51
Figura 13	Concentração das citocinas IL-6, IL-12, IL-1 β e TNF- α no homogenato de linfonodos inguinais nos grupos dos animais estudados, detectados pelo método de ELISA.....	53
Figura 14	Concentração das citocinas IL-6, IL-12, IL-1 β e TNF- α no homogenato de medula espinhal nos grupos dos animais estudados, detectados pelo método de ELISA.....	55
Figura 15	Concentração das quimiocinas CCL5 e CCL20 no homogenato de linfonodos inguinais e medula espinhal nos grupos dos animais estudados.....	57
Figura 16	Análise histológica das amostras de medula espinhal nos grupos dos animais estudados.....	58
Figura 17	Número absoluto de células CD11c ⁺ e células CD11b ⁺ produzindo IFN- γ , determinada por citometria de fluxo de células mononucleares isoladas dos linfonodos inguinais e medula espinhal nos grupos dos animais estudados.....	59
Figura 18	Número absoluto de células MHCII ⁺ F4/80 ⁺ CD11c ⁺ produzindo IL-10 determinada por citometria de fluxo de células mononucleares isoladas dos linfonodos inguinais e medula espinhal nos grupos dos animais estudados.....	60
Figura 19	Níveis de citocinas IFN- γ e IL-17 no homogenato de linfonodos inguinais e medula espinhal nos grupos dos animais estudados.....	62

Figura 20 Níveis de citocina IL-10 e TGF- β no homogenato de linfonodos inguinais e medula espinhal nos grupos dos animais estudados..... 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Efeitos da deficiência de TLRs sobre doenças autoimunes em modelos animais.....	39
Tabela 2	Distribuição dos animais em grupos experimentais.....	42
Tabela 3	Escala neurológica clínica para avaliar a EAE.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag	Antígeno
APC	“Antigen presenting cells”, células apresentadoras de antígenos
Apc	“Allophycocyanin”, alofococianina
BBB	“Blood–brain barrier”, barreira hematoencefálica
BSA	“Bovine serum albumin”, albumina de soro bovino
CCL	“C-C chemokine ligands”, ligante de quimiocina
CCR	“C-C <i>chemokine</i> receptor”, receptor de quimiocina
CD	“Cluster of differentiation”, grupo de diferenciação
CFA	“Freund's Complete Adjuvant” - adjuvante completo de freund's
CTLA-4	“Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4”, antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico
°C	Grau Celsius
DNA	“Deoxyribonucleic acid”, ácido desoxirribonucleico
Dpi	Dias pós-indução
EAE	Encefalomielite autoimune experimental
EDTA	“Ethylene diamine tetracetic acid”, ácido etileno diano tetracético

ELISA	“Enzyme linked immuno sorbent assay”, ensaio imuno enzimático
EM	Esclerose múltipla
FITC	“Fluorescein isotiocionato”, isotiocionato de fluoresceína
Foxp3	“Forkhead box p3”
GM-CSF	“Granulocyte macrophage colony-stimulating factor”, fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos
HBV	“Hepatitis B vírus”, vírus da hepatite B
H&E	Hematoxilina-eosina
ICAM-1	“Intercellular adhesion molecule-1”, molécula de adesão intracelular-1
IFA	“Incomplete Freund’s adjuvante”, adjuvante incompleto de Freund
IFNs tipo I	Interferons do tipo I
IFN- γ	Interferon-gama
IFN- β	Interferon-beta
IL	Interleucina
iNOS	“Inducible nitric oxide synthase”, óxido nítrico sintetase induzível
i.p.	Intraperitoneal
IRFS	“Interferon regulatory factors”, fatores reguladores de interferons

Kg	Kilograma
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
mg	Miligrama
µg	Micrograma
µL	Microlitro
Mm	Micrômetro
MHC-II	“Major histocompatibility complex II genes”, complexo de histocompatibilidade principal de classe II
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MOG	“Myelin oligodendrocyte glycoprotein”, glicoproteína mielínica de oligodendrócito
MyD88	“Myeloid differentiation primary response protein 88”, fator mielóide de diferenciação proteína 88
NF-κB	“Nuclear factor-κB”, fator nuclear kappa B
NaCl	Cloreto de sódio
Ng	Nanograma

NLRs	“NOD-like receptors”, receptores do tipo NOD
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAMPs	“Pathogen-associated molecular patterns”, padrões moleculares associados ao patógeno
PBM	Proteína básica da mielina
PBS	Solução tampão fosfato
PE	“Phycoerythrin”, ficoeritrina
PerCP	“Peridinin chlorofilprotein”, peridinina-clorofilproteína
PLP	“Proteolipid protein”, proteína proteolipídica da mielina
RNA	“Ribonucleic acid”, ácido ribonucleico
RLRs	“RIG-I-like receptors”, receptores do tipo RIG-I
ROS	“Reactive oxygen species”, espécies reativas de oxigênio
PP	Primária-progressiva
PR	Progressiva-recorrente
PRRs	“Pattern recognition receptors”, receptores de reconhecimento de padrão
Rpm	Rotação por minuto
RR	Remitente-recorrente

s.c.	Subcutânea
SEM	“Standard error of mean”, erro padrão da média
SFB	Soro fetal bovino
SNC	Sistema nervoso central
SP	Secundária-progressiva
STAT4	“Signal transducer and activator of transcription 4”, transdutor de sinal e ativador de transcrição 4
TCR	“T cell receptor”, receptor de célula T
TGF- β	“Transforming growth factor-beta”, fator de transformação do crescimento-beta
TIR	“Toll/IL-1R homology domain”, domínio intracelular homólogo ao receptor Toll/IL-1
TNF- α	“Tumor necrosis factor-alpha”, fator de necrose tumoral-alfa
TIRAP	“Toll/interleukin-1 receptor domain containing adaptor protein”, proteína adaptadora contendo domínio TIR
Th1	“T <i>helper</i> 1”, linfócito T auxiliar 1
Th17	“T <i>helper</i> 17”, linfócito T auxiliar 17
TLRs	“Toll-like receptors”, receptores Toll-like
TRAM	“TRIF-related adaptor molecule”, molécula adaptadora relacionada

ao TRIF

TRIF “TIR-domain-containing adaptor inducing interferon β ”, proteína adaptadora contendo domínio TIR induzido por interferon- β

Tregs Linfócitos T reguladores

VCAM-1 “Vascular cell adhesion molecule 1”, molécula de adesão vascular-1

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1	ESCLEROSE MÚLTIPLA	23
2.1.1	Definição.....	23
2.1.2	Epidemiologia.....	26
2.2	ENCEFALOMIELEITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL (EAE)	27
2.3	RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA EAE	28
2.4	RECEPTORES TOLL-LIKE NA EAE	35
3	OBJETIVOS	40
3.1	OBJETIVO GERAL.....	40
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
4	MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1	ANIMAIS.....	41
4.2	INDUÇÃO DO MODELO DE EAE.....	41
4.3	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	42
4.4	AVALIAÇÃO DO SCORE CLÍNICO E MASSA CORPORAL.....	43
4.5	EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DOS ÓRGÃOS E CÉLULAS	44
4.6	QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS POR ELISA.....	44
4.7	ISOLAMENTO DE PREPARAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DOS LINFONODOS INGUINAIS E MEDULA ESPINHAL.....	45
4.8	AVALIAÇÃO DE MARCADORES CELULARES E CITOCINAS INTRACITOPLASMÁTICAS POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	46
4.9	AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA.....	46
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
5	RESULTADOS	48
5.1	AVALIAÇÃO DO SCORE CLÍNICO E MASSA CORPORAL.....	48

5.2	AVALIAÇÃO DO NÚMERO ABSOLUTO DE CÉLULAS MHCII ⁺ F4/80 ⁺ CD11C ⁺ EXPRESSANDO TLR NOS LINFONODOS INGUINAIS.....	50
5.3	AVALIAÇÃO DO NÚMERO ABSOLUTO DE CÉLULAS MHCII ⁺ F4/80 ⁺ CD11C ⁺ EXPRESSANDO TLR NA MEDULA ESPINHAL.....	51
5.4	AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DAS CITOCINAS INFLAMATÓRIAS IL-6, IL-12, IL-1 β E TNF- α EM HOMOGENATO DE LINFONODOS INGUINAIS.....	52
5.5	AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DAS CITOCINAS INFLAMATÓRIAS IL-6, IL-12, IL-1 β E TNF- α EM HOMOGENATO DE MEDULA ESPINHAL.....	54
5.6	AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE QUIMIOCINAS CCL5 E CCL20 EM HOMOGENATO DE LINFONODOS INGUINAIS E MEDULA ESPINHAL.....	56
5.7	AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA MEDULA ESPINHAL.....	58
5.8	AVALIAÇÃO DO NÚMERO ABSOLUTO DE CÉLULAS CD11C ⁺ E CÉLULAS CD11B ⁺ PRODUZINDO IFN- γ NOS LINFONODOS INGUINAIS E MEDULA ESPINHAL.....	59
5.9	AVALIAÇÃO DO NÚMERO ABSOLUTO DE CÉLULAS MHCII ⁺ F4/80 ⁺ CD11C ⁺ PRODUZINDO IL-10 NOS LINFONODOS INGUINAIS E MEDULA ESPINHAL	60
5.10	AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS IFN- γ E IL17 EM HOMOGENATO DE LINFONODOS INGUINAIS E MEDULA ESPINHAL.....	61
5.11	AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DAS CITOCINAS ANTI-INFLAMATÓRIAS IL-10 E TGF- β EM HOMOGENATO DE LINFONODOS INGUINAIS E MEDULA ESPINHAL.....	63
6	DISCUSSÃO	65

7	CONCLUSÃO.....	74
	REFERÊNCIAS.....	75

1 INTRODUÇÃO

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença crônica e inflamatória, caracterizada por infiltração de células imunes no Sistema Nervoso Central (SNC), com destruição da bainha de mielina e perda de oligodendrócitos. É na maioria dos casos grave e incapacitante, afetando cerca de 2,5 milhões de pessoas em todo mundo, entre 17 e 65 anos, atingindo duas vezes mais mulheres que homens.

Devido à dificuldade de acesso ao SNC, os modelos animais de doenças desmielinizantes são fundamentais para a compreensão dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na EM. A Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE) é o modelo murino desenvolvido para entender os eventos neuroimunológicos que ocorrem na doença.

O protocolo geralmente utilizado na indução da EAE exige a aplicação tanto do adjuvante completo de Freund (CFA), contendo *Mycobacterium tuberculosis*, quanto da toxina pertussis e sem esses componentes a resposta imune não é induzida. As razões para isto são atribuídas ao envolvimento de estruturas presentes nas células da imunidade inata, os receptores Toll-like (TLRs), que se ligam aos padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs), os quais são moléculas sinalizadoras derivadas de agentes microbianos. Os TLRs são expressos em células apresentadoras de antígenos (APCs), tais como células dendríticas, macrófagos e micróglia. Estas células são importantes para a eficiente ativação de linfócitos T nos tecidos linfoides secundários e para a manutenção da resposta imune no SNC.

Na EAE existem duas principais fases que constituem a sequência de eventos imunopatológicos: uma fase inicial caracterizada pela ativação de linfócitos autorreativos nos órgãos linfoides periféricos que, posteriormente, migram para o SNC. Neste local ocorre a segunda fase ou fase efetora, em que os linfócitos T antígenos específicos são reapresentados ao antígeno da mielina. Esta reativação desencadeia a produção de mediadores solúveis pelos linfócitos T e pelas células residentes no SNC, recrutando mais células inflamatórias e estabelecendo o dano tecidual.

Diante desta complexa resposta imunológica, que envolve uma diversidade de células e mediadores químicos, este estudo teve por objetivo avaliar a resposta

imune inata no 2º, 4º e 7º dia pós-indução da EAE, estabelecendo possíveis mecanismos que poderão contribuir para o esclarecimento da patogênese da doença e, principalmente, para identificação de alvos para posterior intervenção terapêutica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ESCLEROSE MÚLTIPLA

2.1.1 DEFINIÇÃO

A EM é uma doença inflamatória, crônica e desmielinizante do SNC. É a segunda causa de incapacidade neurológica em adultos jovens (ANDERSON et al., 1992; CZLONKOWSKA et al., 2005; MILO e KAHANA, 2010). Sua etiologia ainda permanece desconhecida (WEINER, 2008), entretanto sabe-se que processos autoimunes aliados a fatores ambientais e genéticos possam estar envolvidos em sua patogênese (ARNASON, 1983; MARTIN, MCFARLAND e MCFARLIN, 1992; SADOVNICK e EBERS, 1993; WUCHERPENNIG e STROMINGER, 1995; SOSPEDRA e MARTIN, 2005; TEIXERA et al., 2005; BASSO et al., 2008).

A resposta autoimune envolvida neste processo é resultado da ação de linfócitos T autorreativos específicos contra a mielina e células da imunidade inata, que infiltram o SNC e medeiam a resposta inflamatória que levam à desmielinização e degeneração axonal progressiva (HAUSER e OKSENBURG, 2006; MILLER e LEARY, 2007; TRAPP e NAVE, 2008, SOULIKA et al., 2009). O SNC é constituído por células especializadas pela geração e transmissão dos impulsos elétricos: os neurônios e células gliais (astrócitos, oligodendrócitos e micróglia), que cumprem a função de sustentar, proteger, isolar e nutrir os neurônios (CARSON, REILLY e SUTCLIFFE, 1998). Os oligodendrócitos são responsáveis pela formação da mielina, uma proteína que envolve firmemente o axônio, parte do neurônio, fornecendo isolamento para rápida condução elétrica. Na ausência de mielina os neurônios sinalizam lentamente ou erroneamente (FRANKLIN e FFRENCH-CONSTANT, 2008; TRAPP e NAVE, 2008).

Esta desmielinização medeia os sintomas e sinais clínicos da doença, tais como problemas sensoriais, motores, neurite óptica e dores neuropáticas (TURLEY e MILLER, 2010). A EM é caracterizada por um quadro de recidivas, sendo esta a característica clínica mais marcante da doença. Embora as recaídas sejam úteis

para o diagnóstico, elas podem produzir perdas funcionais temporárias ou até mesmo permanentes. A incapacitação progressiva é o centro do impacto social, econômico e terapêutico da EM (WEINSHENKER et al., 1989; LUBLIN e REINGOLD, 1996).

É possível distinguir basicamente quatro formas clínicas da doença: no estágio inicial, 85% dos pacientes apresentam o tipo Remitente-Recorrente (RR), com surtos de duração variável, seguidos de um período de remissão e com recuperação total ou parcial do indivíduo afetado. A maioria dos pacientes do tipo RR evolui para a forma Secundária-Progressiva (SP), que após a remissão dos surtos, apresentam leve progressão da doença. Aproximadamente 10% dos pacientes apresentam a EM Primária-Progressiva (PP) que já se inicia de forma progressiva, com platôs ocasionais e com pequenas melhoras temporárias. Na quarta forma, a Progressiva-Recorrente (PR) desde o início observa-se o agravamento da incapacidade com surtos claramente identificáveis com ou sem recuperação do paciente (LUBLIN e REINGOLD, 1996; SOSPEDRA e MARTIN, 2005; LUBLIN, 2007; GOVERMAN, 2009).

Lublin (2007) apresentou estes padrões clínicos da doença em um gráfico, obtido pela medida de escore clínico segundo a Escala Expandida do Estado de Incapacidade, demonstrando as consequências na progressão da EM após os surtos e caracterizando as suas formas clínicas (Figura 1). Ainda de acordo com Lublin (2007), o elevado número de recaídas no primeiro ano está associado a um prognóstico ruim da doença.

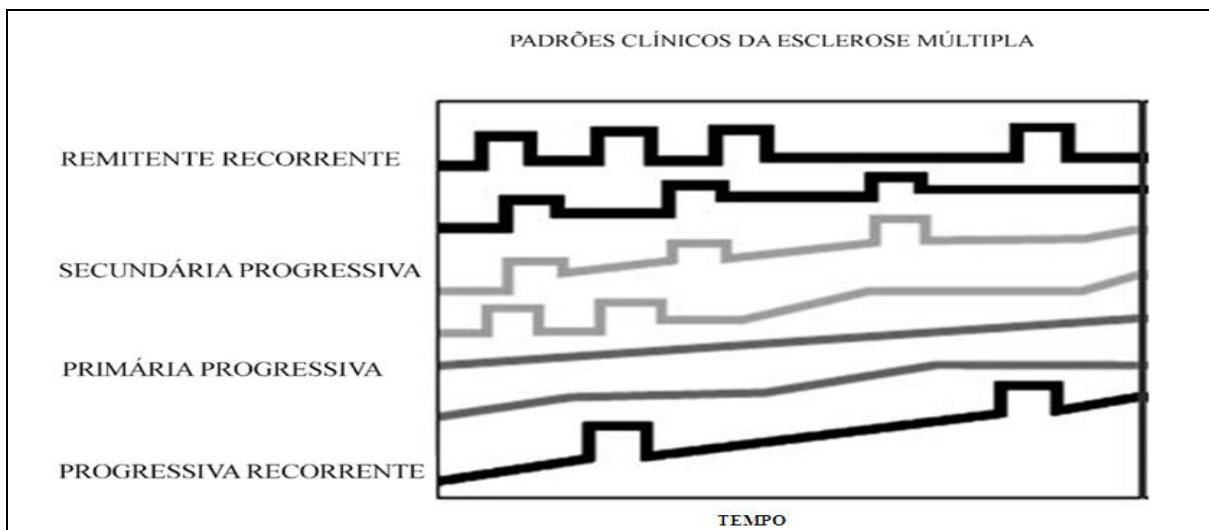


Figura 1. Padrões clínicos da Esclerose Múltipla. A inclinação do gráfico para direita indica piora do escore clínico (Adaptado: LUBLIN, 2007).

As variadas formas clínicas observadas no curso da EM podem ser explicadas pela desmielinização, graus de inflamação, remielinização e neurodegeneração (PETERSON e FUJINAMI, 2007). Segundo Basso e colaboradores (2008), é observada a presença de infiltrados inflamatórios que estão associados à degradação da mielina, presente nos oligodendrócitos e nos axônios, interferindo diretamente na condução nervosa, como mencionado anteriormente.

Os fatores que promovem a ativação periférica de linfócitos T virgens contra proteínas da mielina na EM são ainda desconhecidos. A ativação parece ser resultado da combinação de fatores ambientais e genéticos, que desencadeiam a resposta autoimune contra a bainha de mielina que reveste o axônio dos neurônios (WUCHERPFENNIG e STROMINGER, 1995; BASSO et al., 2008).

Os fatores ambientais estão principalmente relacionados às infecções virais e bacterianas. A semelhança estrutural entre a mielina e proteínas associadas a patógenos podem desencadear a reação inflamatória no SNC (FUJINAMI e OLDSTONE, 1985; WUCHERPFENNIG e STROMINGER, 1995; BULJEVAC et al., 2002). Fujinami e Oldstone (1985) verificaram uma semelhança estrutural entre o peptídeo do vírus da hepatite B (HBV) com a proteína básica da mielina (PBM) e, concluíram que a infecção por HBV, associada com outros fatores, poderia desencadear a EM, por ativação de linfócitos 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 já são conhecidos 18 alelos associados ao risco de desenvolvimento doença.

2.1.2 EPIDEMIOLOGIA

A EM é uma doença que apresenta uma grande variação de incidência e prevalência no mundo. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) (2008), a estimativa mundial média de prevalência da EM é de 30 para cada 100.000 habitantes, com 80 indivíduos para cada 100.000 habitantes na Europa, 14,9 para o Mediterrâneo Oriental, 8,3 nas Américas, 5,0 no Pacífico Ocidental, 2,8 para Sudeste da Ásia e 0,3 para a África (Figura 2).

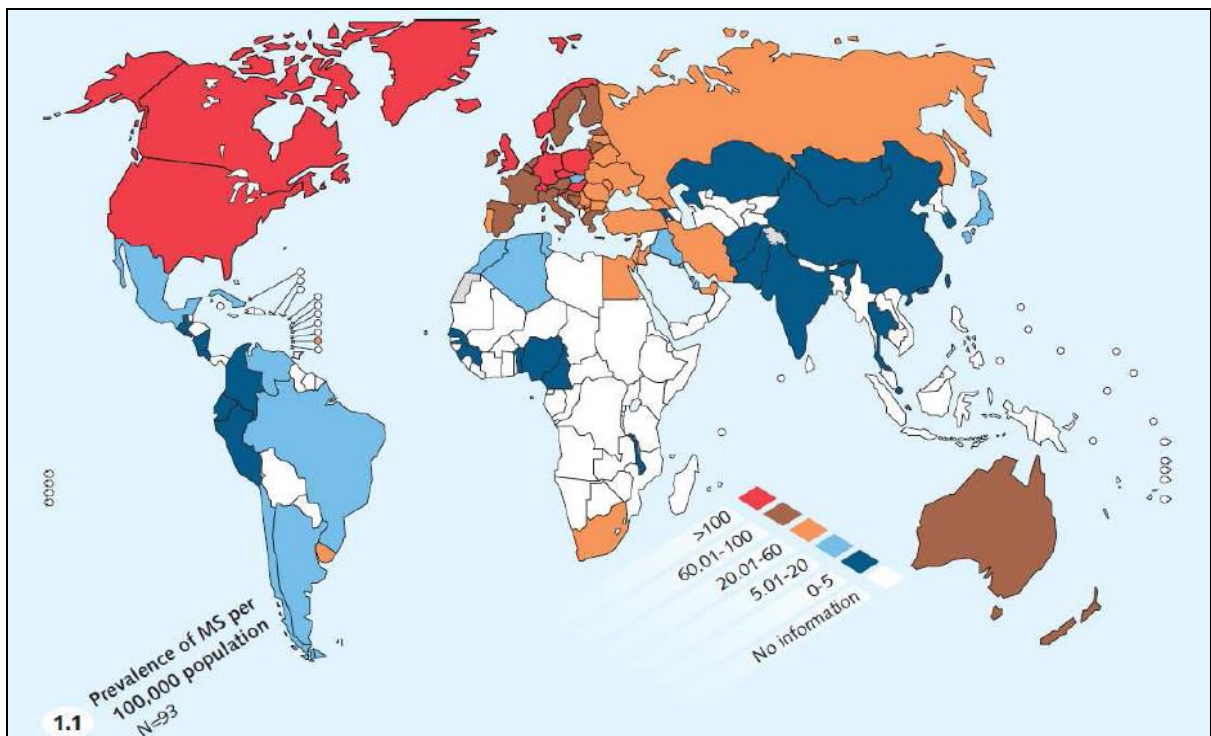


Figura 2. Distribuição mundial da prevalência de EM segundo Organização Mundial de Saúde (OMS, 2008).

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

No Brasil, não existem dados estatísticos nacionais, apenas dados epidemiológicos regionais, onde essa prevalência varia conforme a região geográfica. Na região Nordeste (área mais próxima da linha do Equador) a prevalência é de 10 casos por 100.000 habitantes (FERREIRA et al., 2004). Na

região Sudeste (dados de São Paulo, Santos, Belo Horizonte, Uberaba, Botucatu e Sorocaba) essa prevalência aumenta para 12 a 18 por 100.000 habitantes (CALLEGARO, GOLDBAUM e MORAIS, 2001; LANA-PEIXOTO et al., 2002; ROCHA, HERRERA e MORALES, 2002; FRAGOSO e PERES, 2007; RIBEIRO et al., 2011). Na região centro-oeste varia de 4,41 a 19 para 100.000 habitantes (GRZESIUK, 2006; DINIZ et al., 2008) e na região Sul a prevalência é a maior do País, variando entre 14 a 27 para 100.000 habitantes (KAIMEN-MACIEL et al., 2004).

Alguns estudos demonstram que a EM é mais comum em indivíduos caucasianos do que em indivíduos não caucasianos, entretanto, a OMS (2008) ressalta a necessidade de considerarmos as limitações regionais, como por exemplo, no continente Africano onde há restrições ao atendimento médico neurológico, assim como, a dificuldade de acesso para o diagnóstico. Estas devem ser variáveis importantes nos dados epidemiológicos.

2.2 ENCEFALOMIELEITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL (EAE)

A EAE é o modelo animal mais utilizado para o estudo da EM. Várias razões contribuem para a escolha deste padrão de autoimunidade antígeno-induzido, 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 de camundongo C57BL/6 tem sido usada na indução de EAE crônica e grave, especialmente quando se aplica a glicoproteína mielínica de oligodendrócitos (MOG) como indutora da doença. Esta proteína tem sido utilizada com base em estudos que apoiam a possibilidade dela ser o antígeno-alvo primário no desenvolvimento da EM, mesmo sendo esta muito menos abundante que a PBM (ADELMANN et al., 1995; SOSPEDRA e MARTIN, 2005).

A forma mais comum de indução da EAE é pela injeção subcutânea (s.c.) da MOG, emulsificadas em CFA, contendo *Mycobacterium tuberculosis*, cepa H37RA, seguido por injeção intraperitoneal (i.p.) de toxina pertussis (BILLIAU e MATTHYS,

2001; MIX, MEYER-RIENECKER e ZETTL, 2008). A adição de micobactérias amplifica a resposta, permitindo a hiperplasia do linfonodo e, principalmente, a ativação da resposta imune celular (TEIXEIRA et al., 2005).

Outra forma de indução de EAE é a transferência adotiva de linfócitos CD4⁺ T *helper* 1 (Th1) reativos contra a mielina, para animais saudáveis que passam a desenvolver posteriormente a doença (MIX, MEYER-RIENECKER e ZETTL, 2008).

Neste contexto, o modelo de EAE é extremamente útil para a avaliação dos mecanismos imunológicos envolvidos na EM e no estudo de novos tratamentos para esta patologia (ADELMANN et al., 1995; SOSPEDRA e MARTIN, 2005).

2.3 A RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA EAE

A imunidade inata é a primeira defesa do hospedeiro contra infecções e está presente em todos os organismos multicelulares. É um sistema multicomponente, desempenhando duas funções principais: primeiro, fornecer a resposta inicial contra patógenos, prevenindo, controlando e eliminando infecções, em segundo lugar, tem a capacidade de estimular e modular a imunidade adaptativa (MODLIN, 2012).

A primeira linha de defesa do sistema imune inato incluem barreiras celulares, tais como a pele, superfícies mucosas do sistema gastrointestinal e trato respiratório e a barreira hematoencefálica (BBB). A segunda linha é composta por células, incluindo as células dendríticas, que se caracterizam pela expressão de CD11c, macrófagos, caracterizados pela expressão de CD11b e F4/80, monócitos, células natural killer, mastócitos, granulócitos, linfócitos T $\gamma\delta$ e células da glia. Estas células desempenham várias funções, tais como apresentação de antígenos, ativação de receptores e secreção de mediadores inflamatórios (MURPHY et al., 2010, MODLIN, 2012).

A ativação da imunidade inata se dá pela interação de receptores, como os TLRs, com seus ligantes específicos: os PAMPs, que podem ser os diferentes componentes microbianos. Desta forma o organismo hospedeiro detecta a infecção e induz a resposta imune inata (LEMAITRE et al., 1996, PRINZ et al., 2006) (Figura 3). Esta imunidade é capaz de responder rapidamente aos agentes

infecciosos, mas não produz resposta de memória de longo prazo para um dado patógeno (BRENNAN e ANDERSON, 2004).

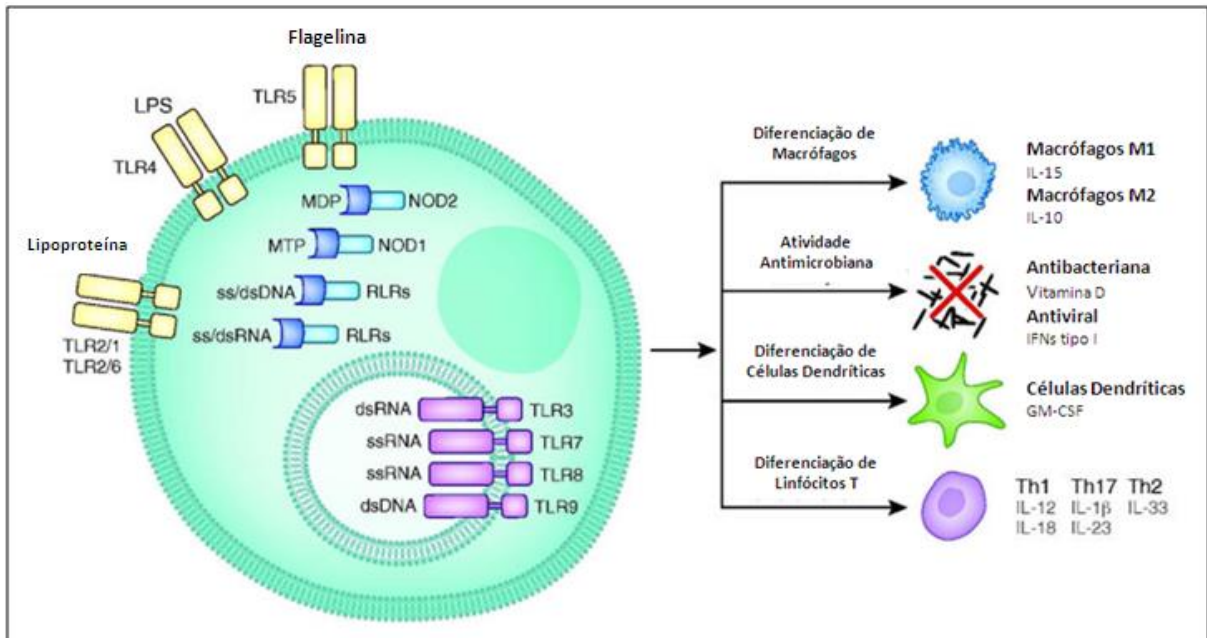


Figura 3. Vias da imunidade inata contra as infecções. Receptores imunes inatos específicos residem em compartimentos subcelulares, incluindo a superfície celular, citoplasma e endossomo, proporcionando a oportunidade de reconhecer diferentes ligantes microbianos. Entre estes receptores estão os TLRs, NLRs (receptores do tipo NOD) e RLRs (receptores do tipo RIG-I). A ativação da imunidade inata leva a respostas imunes que contribuem para a diferenciação de monócitos em subconjuntos de macrófagos (M1 e M2), atividade antimicrobiana, diferenciação de células dendríticas e linfócitos T. (GM-CSF = fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos; IL = Interleucina; IFNs tipo I = Interferons do tipo I; LPS = lipopolissacarídeo) (Adaptado: MODLIN, 2012).

O sistema imune adaptativo, representado por linfócitos T e B, promove respostas imunes que são mais específicas para um dado antígeno (WEINER, 2008). As células T $CD4^+$ reconhecem apenas antígenos proteicos, na forma de peptídeos, apresentados via complexo de histocompatibilidade principal de classe II (MHC-II), enquanto que as células B podem reconhecer peptídeos, proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos, lipídeos e pequenas substâncias químicas (STUVE et al., 2002; ACKERMAN e CRESSWELL, 2004). A especificidade antigênica é determinada pela interação das proteínas do MHC, expressas na superfície das APC, com o receptor de célula T (TCR). Os antígenos proteicos são capturados, processados e apresentados na superfície celular das APC, onde podem ser reconhecidos, levando à ativação, proliferação e diferenciação dos linfócitos T $CD4^+$ para o fenótipo efetor (Th1 ou Th17) com liberação de citocinas inflamatórias (WEAVER et al., 2006; WEINER, 2008).

O ataque autoimune à bainha de mielina que ocorre na EAE envolve, de maneira coordenada, vários tipos celulares do sistema imune inato e adaptativo (Figura 4). Neste caso, os antígenos reconhecidos parecem ser as proteínas da mielina (WEINER, 2008). Na superfície das APCs estes autoantígenos são apresentados, via MHC-II, aos linfócitos T CD4⁺ periféricos (STUVE et al., 2002; WEINER, 2008). Konno e colaboradores (1989) encontraram maior expressão das moléculas de MHC-II sobre as APCs dos animais analisados, promovendo o desenvolvimento da EAE, pela ativação de populações de linfócitos T CD4⁺ autorreativos.

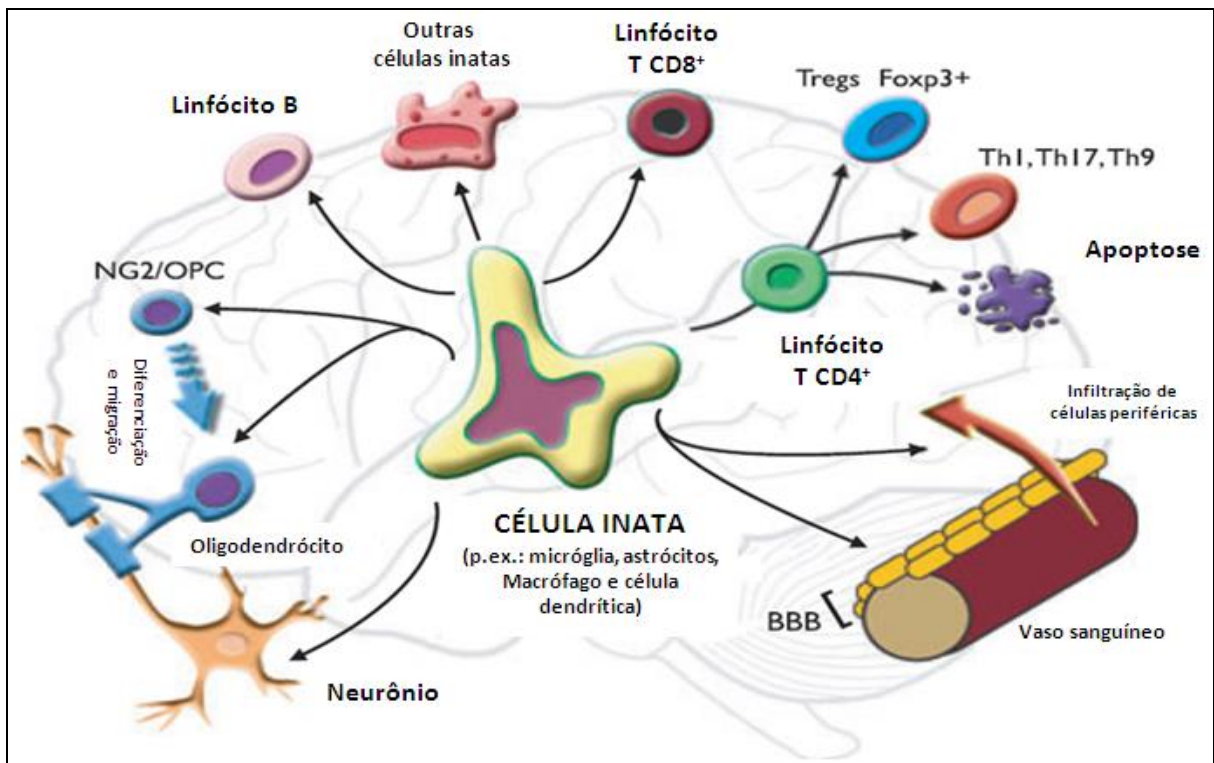


Figura 4. O papel do sistema imune inato na EAE. Uma célula inata no SNC pode recrutar células periféricas afetando a integridade da BBB. Pode também ativar linfócitos T CD4⁺ levando à diferenciação do fenótipo efetor (Th1, Th17 ou Th9), fenótipo regulatório (Treg Foxp3⁺) ou encerrar a resposta T CD4⁺ induzindo a apoptose. A célula inata pode também ativar e modular outras células adaptativas, tais como linfócitos T CD8⁺ citotóxicas, linfócito B. Atua também diretamente nos processos desmielinizantes, atingindo as NG2/OPC (células precursoras de oligodendrócitos) comprometendo a viabilidade neuronal (Adaptado: MAYO, QUINTANA e WEINER, 2012).

Além das proteínas do MHC-II, moléculas co-estimulatórias, tais como B7 e CD40, também são necessárias para a apresentação de antígeno. Ambas B7.1 (CD80) e B7.2 (CD86) são ligantes de superfície das proteínas CD28, importantes na ativação do linfócitos T, e do antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico (CTLA-4), este inibe os sinais desta ativação (SHRIKANT e BENVENISTE, 1996) (Figura 5).

Srinivasan e colaboradores (2002), encontraram durante a progressão da EAE, macrófagos expressando elevados níveis de B7.1 em sua superfície, sugerindo que o bloqueio da interação B7.1-CD28 suprimia a resposta inflamatória, o que parecia ser em função da deleção periférica de linfócitos T CD4⁺ antígeno específicos (DUNCAN e MILLER, 2011).

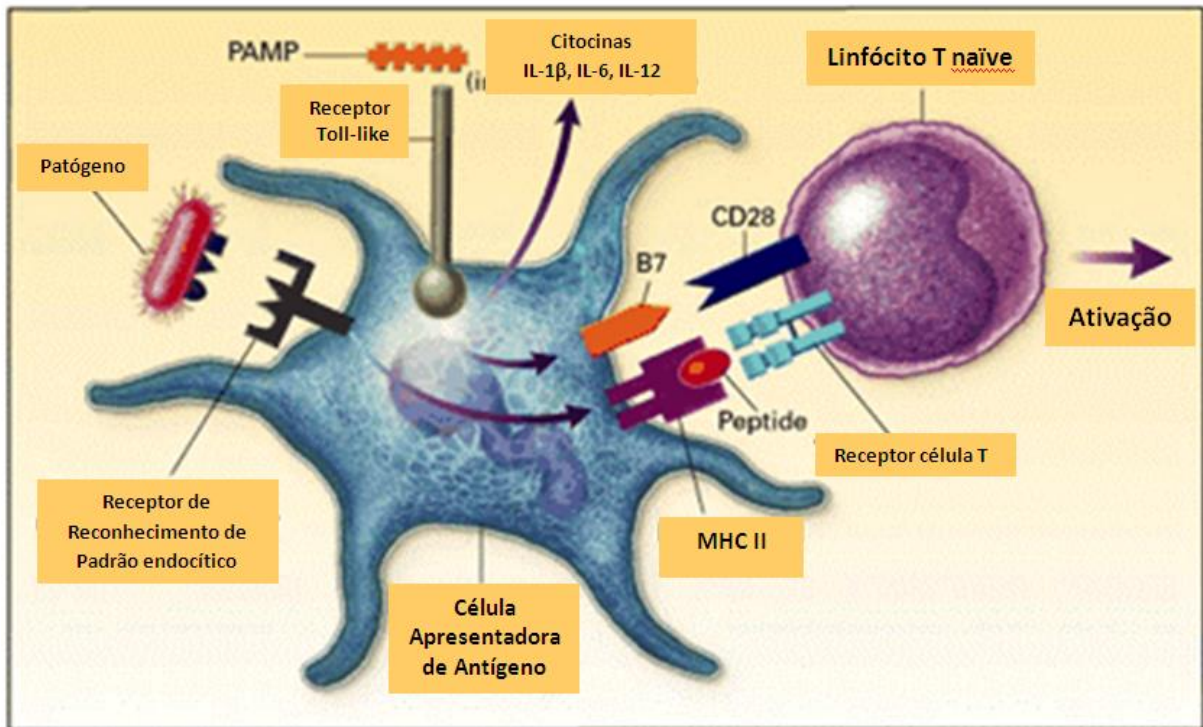


Figura 5. Os receptores envolvidos na co-ativação do sistema imune inato e adaptativo (Adaptado: MEDZHITOV e JANEWAY, 2000).

Assim, o processo de desmielinização inicia-se após a ativação destes linfócitos T CD4⁺ periféricos reativos à mielina, que atravessam a BBB em direção ao SNC (RANSOHOFF, KIVISAKK e KIDD, 2003). Os determinantes moleculares que controlam este passo inicial de migração celular para o SNC envolvem integrinas e moléculas de adesão que permitem aderência e rolamento dos linfócitos T através das paredes dos vasos (KERFOOT e KUBES, 2002; PICCIO et al., 2002; JAMES, BULLARD e HICKEY, 2003). Além disso, há a ação de quimiocinas, que são citocinas produzidas localmente com atividade quimiotática. A interação destas quimiocinas com o seu receptor na superfície celular, promovem o direcionamento da migração e a chegada de leucócitos e outras células para o sítio inflamatório (McQUIBBAN et al., 2002; BELMADANI et al., 2006). No SNC, os autoantígenos da mielina são reapresentados por APC residentes, como a micróglia, aos linfócitos T

CD4⁺ antígenos específicos, desencadeando uma cascata que libera mediadores inflamatórios, que incluem interleucina (IL)-6, IL-12, IL-1 β , fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e interferon-gama (IFN- γ), que culmina com a lesão ou destruição da bainha de mielina (RANSOHOFF; KIVISAKK; KIDD, 2003).

Estudos anteriores caracterizavam a EAE como uma doença mediada apenas por linfócitos Th1 e pela produção de citocinas relacionadas a este tipo celular, como IFN- γ (MARCONDES et al., 2005; SOSPEDRA e MARTIN, 2005; WENSKY et al., 2005). No entanto, trabalhos recentes relatam que além dos linfócitos Th1, os linfócitos Th17, produtores de IL-17, estão diretamente relacionados com o desenvolvimento da EAE (LAURENCE e O' SHEA, 2007; KANG et al., 2010; MURPHY et al., 2010; EDWARDS et al., 2011).

A polarização dos linfócitos Th17 ocorre na presença de IL-23, IL-6 e do fator de transformação do crescimento-beta (TGF- β) De acordo com protocolos experimentais que utilizaram 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, conseqüentemente, dos linfócitos Th17 (ZELANTE et al., 2007; KROENKE et al., 2008; QUINTANA e WEINER, 2009; MIOSSEC, 2009).

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

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

Apesar das pesquisas mostrarem o envolvimento da resposta imune mediada por células, a produção de autoanticorpos também tem sido demonstrada como um importante fator na desmielinização dos axônios. O aumento das concentrações de imunoglobulinas no líquido cefalorraquidiano (LCR) e a presença

de anticorpos antimielina indica o envolvimento de linfócitos B (resposta humoral) no processo inflamatório (MARTIN, MCFARLAND e MCFARLIN, 1992).

Finalmente, na tentativa de regular todo este processo inflamatório, estabelecido no SNC, outra população de linfócitos T CD4⁺, que se caracteriza pela expressão de CD25 e de Foxp3, referida como linfócitos T regulatórios (Tregs), atua inibindo o processo inflamatório na EAE, principalmente, pela produção de mediadores anti-inflamatórios como IL-4, IL-10 e TGF- β induzindo a tolerância (BETTELLI et al., 1998; BETELLI et al., 2006; WEINER, 2008) (Figura 6).

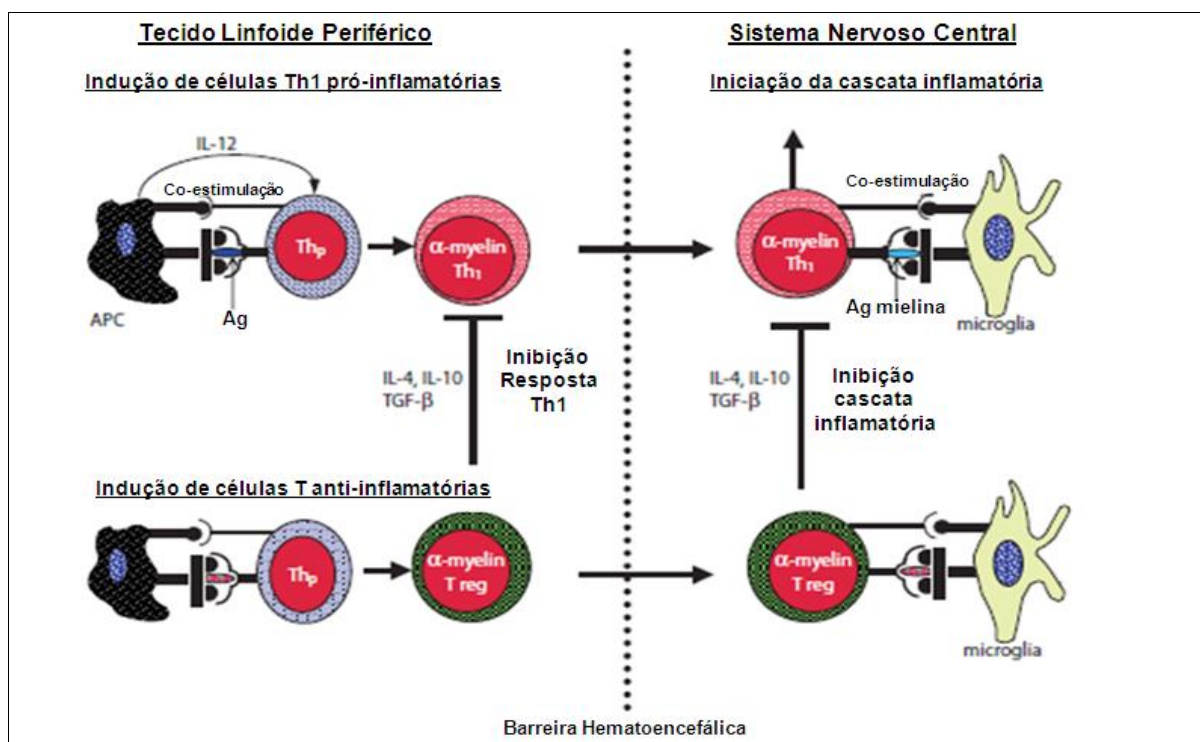


Figura 6. Representação esquemática do processo autoimune na EAE. Na periferia APCs apresentam o antígeno (Ag) específico da mielina ao linfócito Th, secretam citocina IL-12 ativando este linfócito, este se diferencia em linfócito Th1. Mediante expressão de moléculas de adesão e liberação de quimiocinas pelas células do sistema imune, migram para SNC, neste local são reapresentados ao Ag da mielina por células residentes (microglia). Inicia-se então uma cascata inflamatória que leva à desmielinização e dano axonal. Na tentativa de conter esta resposta inflamatória, linfócitos T regulatórios (Treg) podem ser ativados, secretando mediadores químicos anti-inflamatórios, como IL-10, fator de transformação do crescimento-beta (TGF- β) e IL-4 (Adaptado: WEINER, 2008).

Entretanto, esta produção de mediadores anti-inflamatórios não é exclusividade de Tregs, sendo também produzidos por macrófagos (PETSKA et al., 2004). Não está claro se diferentes estímulos podem agir nos macrófagos para induzir a produção de uma citocina reguladora como IL-10 e citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-12, ou se os mesmos estímulos desencadeiam a

produção de todas essas citocinas, mas com cinéticas diferentes (BRUCK et al., 1996; SEKI et al., 1998; PETSKA et al., 2004; NIELSEN et al., 2010).

Várias populações de macrófagos têm sido estudadas, e duas foram identificadas nas lesões teciduais da EAE: o pró-inflamatório, macrófago classicamente ativado (fenótipo M1) e o imunomodulador, macrófago alternativamente ativado (fenótipo M2) (MARTINEZ et al., 2008) (Figura 7).

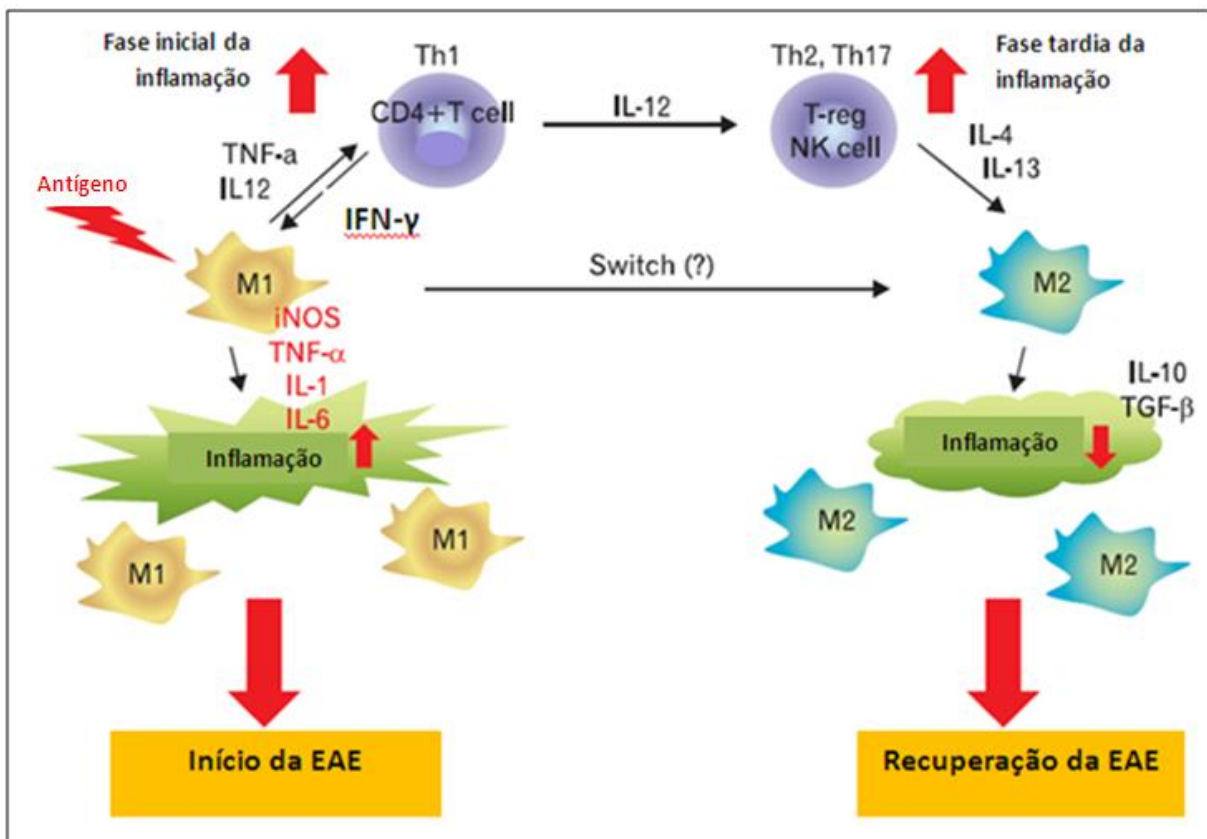


Figura 7. Diagrama esquemático do papel de cada população de macrófagos na EAE (Adaptado: SHIN, AHN e MATSUMOTO, 2012).

O macrófago é considerado importante célula na fase de indução da EAE (JUNG et al., 1993; HUITINGA et al., 1993). A expressão de mediadores pró-inflamatórios, como TNF- α e óxido nítrico sintetase induzível (iNOS), estão associados às células do fenótipo M1, que infiltram no SNC, preferencialmente na fase aguda da EAE (SHIN et al., 1995), enquanto que células do fenótipo M2, produtoras de IL-10 e TGF- β são observadas no pico e mantém-se elevada durante a fase de recuperação da doença (WEBER et al., 2007).

Desta forma, a resposta imune na EAE, apesar de ser caracterizada como um processo inflamatório crônico mediado por linfócitos T CD4⁺, é totalmente

dependente da ativação de componentes da resposta imune inata, como os TLRs e APCs, tanto na periferia, durante o processo de polarização de linfócitos T autorreativos, como no SNC, ao reativar estes linfócitos T antígenos específicos, estabelecendo o processo inflamatório desmielinizante.

2.4 OS RECEPTORES TOLL-LIKE NA EAE

Os TLRs são denominados receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) que atuam como mediadores cruciais da resposta imune inata. A proteína *Toll* foi primeiro identificada como o produto de transcrição de um gene envolvido no estabelecimento do eixo dorsoventral durante o desenvolvimento embrionário da mosca *Drosophila melanogaster* (HASHIMOTO, HUDSON e ANDERSON, 1988). Mais tarde, Lemaitre e colaboradores (1996) demonstraram que esta proteína desempenhava um papel crítico na imunidade da *Drosophila* contra infecções fúngicas. Este estudo mostrou que o sistema imunológico, em particular, o sistema imune inato, possui mecanismos hábeis para detectar a invasão de microrganismos.

Posteriormente, foram identificados homólogos da proteína *Toll* em mamíferos e, designados como receptores de reconhecimento tipo Toll-like, pois sua análise funcional revelou que eles reconheciam padrões específicos de componentes microbianos que são conservados entre os patógenos, mas que não são encontrados nos mamíferos. O receptor Toll-like 4 (TLR-4) foi o primeiro homólogo da proteína *Toll* identificado em mamíferos como um receptor de PAMPs (MEDZHITOV, PRESTON-HURLBURT e JANEWAY, 1997). Outros receptores desta família foram descobertos e mostraram também desempenhar uma função na geração de resposta imunológica contra infecções nos mamíferos (TAKEDA e AKIRA, 2004; KAWAI e AKIRA, 2006; UEMATSU e AKIRA, 2006).

Até o presente momento, 11 TLRs humanos e 13 TLRs murinos foram identificados, os quais desencadeiam as respostas imunes inatas e adaptativas. (TAKEDA e AKIRA, 2004; KAWAI e AKIRA, 2006; UEMATSU e AKIRA, 2006).

Os TLRs são expressos em diversas células, tais como macrófagos, células dendríticas, células da glia, neurônios, célula vascular endotelial, plaquetas, células epiteliais e adiposas, células do músculo esquelético, células β pancreáticas,

hepatócitos, linfócitos B e T (BSIBSI et al., 2002; TAKEDA e AKIRA, 2004; KABELITZ, 2007; LAMPROPOULOU et al., 2008). Os receptores TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10 e possivelmente o TLR11, são expressos na superfície celular, enquanto que os TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9, são expressos em endossomos intracelulares (TAKEDA e AKIRA, 2004). Os PAMPs derivados de patógenos, incluindo lipídeos, lipopeptídeos, proteínas, polissacarídeos e ácidos nucleicos, têm sido descrito como ligantes de vários TLRs. (MEDZHITOV e JANEWAY, 2000). (Figura 8).

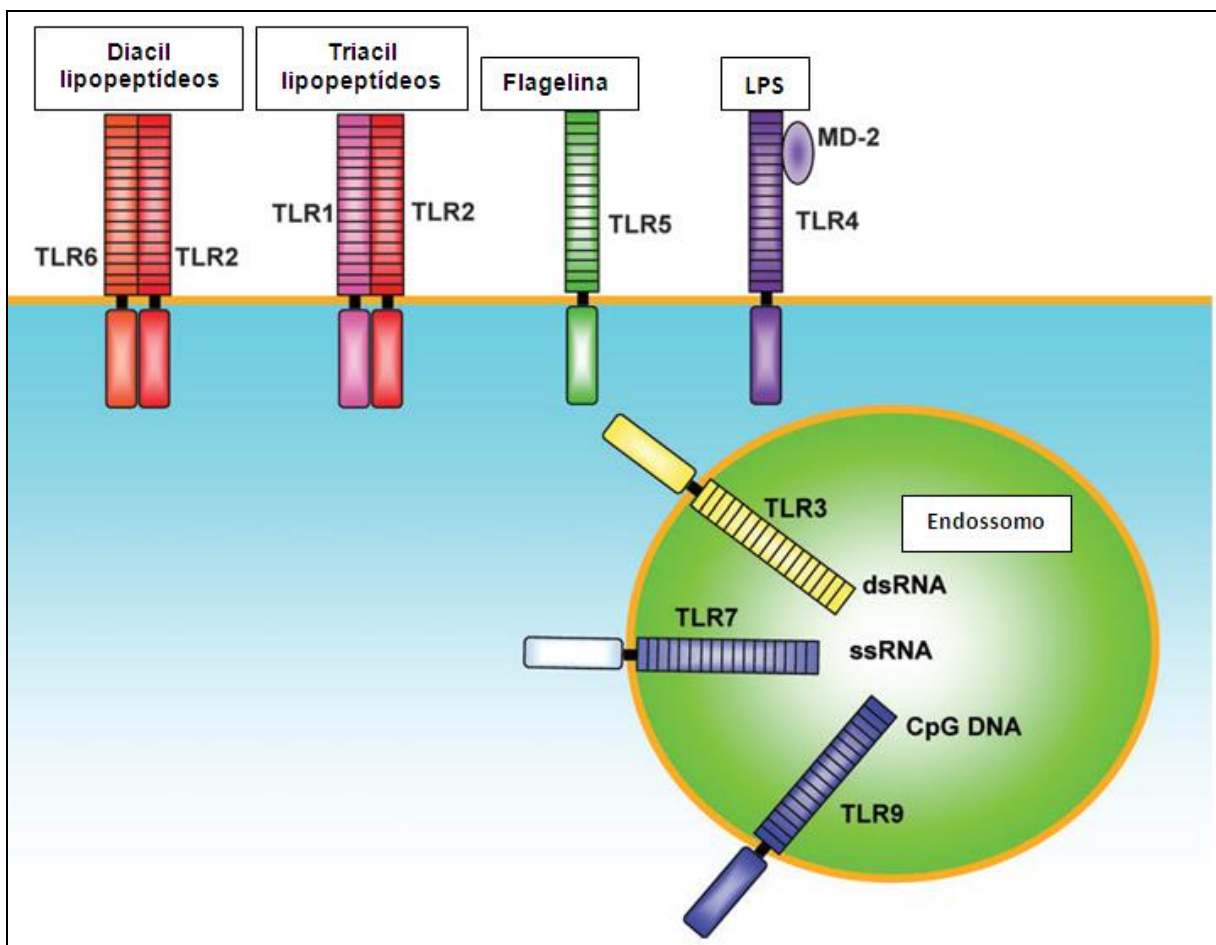


Figura 8. Receptores Toll-like (TLRs) e seus ligantes. O TLR2 é essencial para o reconhecimento de lipopeptídeos microbianos; TLR1 e TLR6 cooperam com o TLR2 para discriminarem entre os subtipos triacil e diacil lipopeptídeos, respectivamente; TLR4 é o receptor para o LPS; TLR9 é importante para o reconhecimento do CpG DNA. Os TLR3, TLR7 e TLR8 são requeridos para o reconhecimento de RNA viral; TLR5 reconhece flagelina. (Adaptado: TAKEDA e AKIRA, 2005).

Os genes dos TLRs codificam glicoproteínas, que contêm repetições ricas em leucina em suas regiões extracelulares e um domínio intracelular homólogo ao

receptor Toll/IL-1 (TIR). O domínio extracelular interage com o ligante específico e o domínio TIR intracelular recruta proteínas adaptadoras (MEDZHITOV et al., 1998).

A ligação do TLR ao ligante específico resulta na ativação das células através da via de sinalização que envolve o recrutamento de proteínas adaptadoras, incluindo o fator mieloide de diferenciação 88 (MyD88), TRIF (proteína adaptadora contendo domínio TIR induzindo interferon- β), TIRAP (proteína adaptadora contendo domínio TIR) ou TRAM (molécula adaptadora relacionada ao TRIF). A partir daí, desencadeia uma cascata de eventos de sinalização resultando na ativação dos fatores de transcrição AP-1, fator nuclear (NF- κ B), e fatores reguladores de interferons (IRFs), com subsequente expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-12, IL-1 β , e TNF- α), interferons do tipo I (IFNs), quimiocinas (CCL2, CCL5 e CXCL8), moléculas de adesão endotelial e co-estimulatórias (CD80 e CD86) (KENNY e O'NEILL, 2008; WEST, KOBLANSKY e GHOSH, 2006).

Os TLRs, com exceção do TLR3, sinalizam através da proteína adaptadora MyD88, levando a ativação do fator de transcrição NF- κ B (YAMAMOTO et al., 2003). O TLR3 sinaliza através de uma via dependente da proteína adaptadora TRIF (conhecida como via independente de MyD88), levando a ativação de NF- κ B e também IRFs. O TLR4 utiliza as duas vias de sinalização citadas acima. (FITZGERALD et al., 2003; OSHIUMI et al., 2003; YAMAMOTO et al., 2003).

Estudos anteriores sugerem que TLRs que sinalizam através da via dependente de MyD88 desempenham um papel significativo no desenvolvimento da EAE, por ativação dos fatores de transcrição NF- κ B e AP-1, que ativam a expressão de uma variedade de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, bem como outras moléculas importantes na apresentação de antígeno, que levam ao processo inflamatório característico na doença (PRINZ et al., 2006; MARTA et al., 2008).

O protocolo geralmente utilizado na indução da EAE exige a aplicação tanto de CFA quanto da toxina pertussis. É importante ressaltar que o *M. tuberculosis*, presente no adjuvante, pode ativar vários TLRs, incluindo os TLR1, TLR2, TLR4 e TLR9, ajudando no desenvolvimento da doença (HANSEN et al., 2006; PRINZ et al., 2006; MARTA et al., 2008). Em estudo realizado por Hansen e colaboradores (2006) camundongos imunizados com o peptídeo MOG₃₅₋₅₅, na presença de adjuvante incompleto de Freund (IFA) só desenvolveram EAE quando o *M. tuberculosis* foi

adicionado ao adjuvante, reforçando mais uma vez a importância dos fatores ambientais na patogênese da doença.

Recentemente, foi relatado que outros adjuvantes, tais como CpG DNA, ligante do TLR9, também podem estimular a indução de EAE (SEGAL, CHANG e SHEVACH, 2000; DENG et al., 2003; WOLF, AMOUZEGAR e SWANBORG, 2007; MIRANDA-HERNANDEZ et al., 2011). Prinz e colaboradores (2006) demonstraram que os camundongos deficientes em TLR9 (TLR9^{-/-}) foram menos susceptíveis à doença, com menor número de infiltrados inflamatórios no SNC e menores áreas de desmielinização. Ressaltando que o TLR9 é necessário para indução e progressão da EAE.

Alguns estudos indicam que a toxina pertussis, que é comumente coadministrada durante protocolos de indução da EAE, estimula vias de sinalização do TLR4. Além disso, a toxina pertussis também pode induzir a expressão de moléculas de adesão, aumentando a interação de leucócitos com células endoteliais, facilitando a infiltração de linfócitos T no SNC (KERFOOT et al., 2004; RACKE, HU e LOVETT-RACKE, 2005).

Como citado anteriormente, que o TLR4 pode desencadear tanto a sinalização MyD88-dependente quanto a MyD88-independente (FITZGERALD et al., 2003; KERFOOT et al., 2004; PRINZ et al., 2006; MARTA et al., 2008), o que pode ajudar a explicar os resultados contraditórios sobre os efeitos dos seus agonistas na modulação da EAE: o TLR4 se liga ao lipopolissacarídeo (LPS) presente no CFA levando a resposta pró-inflamatória Th1 (SCHNARE et al., 2001), induzindo a EAE mas com menor gravidade, isto porque esta resposta imune pode inibir diferenciação de linfócitos Th17, sendo estes linfócitos os responsáveis pelo agravamento da doença, como demonstrado *in vitro* por Harrington e colaboradores (2005). Entretanto estudos posteriores a este demonstraram que camundongos deficientes em TLR4 (TLR4^{-/-}) apresentam aumento na expressão de IL-6 e IL-23 por células dendríticas mielóides do baço, elevando a frequência de linfócitos Th17, o que leva ao aumento dos níveis séricos de IL-17 e, como consequência, os animais apresentam aumento dos sinais clínicos da EAE (MARTA et al., 2008).

Além disso, Hansen e colaboradores (2006) sugeriram que TLRs que sinalizam através da via MyD88-independente podem suprimir o desenvolvimento da EAE, como por exemplo, o TLR3. Guo, Chang e Cheng (2008) relataram que a ativação desta via de sinalização resulta na produção significativa de IFN- β , o qual

desempenha um papel importante na supressão da EAE. Estes autores ressaltaram que a produção de IFN- β induz a produção da citocina IL-27 pelas células do sistema imune inato, e que esta citocina está envolvida na supressão dos linfócitos Th17, críticos na formação do processo inflamatório encontrado na doença.

Os dados apresentados nesses estudos demonstram que a expressão dos TLRs por uma variedade de células está elevada no SNC durante o desenvolvimento da EAE (ZEKKI, FEINSTEIN e RIVEST, 2002; PRINZ et al., 2006; XU e DREW, 2007). Sendo assim, agentes que modulem especificamente as vias de sinalização TLRs podem ser efetivos no tratamento da EAE e EM (Tabela 1).

Portanto, baseado nos trabalhos feitos até o momento, o estudo dos mecanismos de modulação imunológica envolvidos, principalmente, nos pontos iniciais da indução da EAE, ou seja, na resposta imune inata, pode estabelecer os alvos terapêuticos para a EM.

Tabela 1. Efeitos da deficiência de TLRs sobre a EAE em modelos animais (Adaptado: MILLS, 2011).

Modelo	TLR	Intervenção	Resposta Inata	Resposta Adaptativa	Doença
EAE					
MOG + CFA	MYD88	Knockout	↓ IL-6, IL-23	↓ IL-17	Resistência
MOG + CFA	MYD88	Knockout	ND	↓ IFN- γ	Resistência
MOG + CFA	TLR2	Knockout	ND	ND	Normal
MOG + CFA	TLR3	Knockout	↓ IFN- β , IL-27	↑ IL-17	Aumento
MOG + CFA	TLR9	Knockout	ND	ND	Redução
MOG + CFA	TLR4, TLR9	Knockout	↑ IL-6, IL-23	↑ IL-17	Aumento

(ND = não determinado; Knockout = camundongo deficiente geneticamente modificado).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a resposta imune inata no 2º, 4º e 7º dia de desenvolvimento do modelo de Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o escore clínico e a massa corporal dos animais induzidos com EAE;
- Avaliar a expressão dos receptores Toll-like TLR3, TLR4 e TLR9 em células isoladas dos linfonodos inguinais e medula espinhal no 4º dia pós-indução, através de citometria de fluxo;
- Quantificar os níveis de citocinas IL-6, IL-12, IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-17, IL-10 e TGF- β no homogenato dos linfonodos inguinais e medula espinhal no 2º, 4º e 7º dia pós-indução, através de ELISA;
- Quantificar os níveis de quimiocinas (CCL5 e CCL20) no homogenato dos linfonodos inguinais e medula espinhal no 2º, 4º e 7º dia pós-indução, através de ELISA;
- Avaliar os marcadores celulares CD11b, CD11c, F4/80 e MHC em células isoladas dos linfonodos inguinais e medula espinhal no 4º dia pós-indução, através de citometria de fluxo;
- Avaliar a expressão de citocinas intracelulares IFN- γ , IL-17 e IL-10 em células isoladas dos linfonodos inguinais e medula espinhal no 4º dia pós-indução, através de citometria de fluxo;
- Realizar análise histológica da medula espinhal no 2º, 4º e 7º dia pós-indução.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Para a indução da EAE foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6, fêmeas, com 6-8 semanas de idade, provenientes do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). Os animais foram mantidos no setor de experimentação do Laboratório de Imunologia-ICB/UFJF, acondicionados em estantes ventiladas e receberam ração e água *ad libitum*. Todos os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos postulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais da UFJF (protocolo nº 028/2011).

4.2 INDUÇÃO DO MODELO DE EAE

Os animais foram imunizados por via s.c., em ambos os lados da base da cauda, com emulsão contendo 100µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅/animal (o peptídeo MOG₃₅₋₅₅ foi sintetizado pela professora Dra. Maria Aparecida Juliano do Departamento de Biofísica, da Universidade Federal de São Paulo) e adjuvante completo de Freund (CFA) suplementado com 4 mg/mL de *M. tuberculosis* (H37RA; Difco Laboratories, Detroit, MI). No dia da imunização e 48 horas após, os animais receberam 300ng de toxina pertussis (Islet - Activating Protein; List Biologic Laboratories, INC., Campbell, CA) por via i.p. e avaliados em três pontos distintos: 2º, 4º e 7º dias pós-indução (dpi). Os animais sacrificados no 2º dpi não receberam a segunda dose de toxina pertussis (Figura 9).

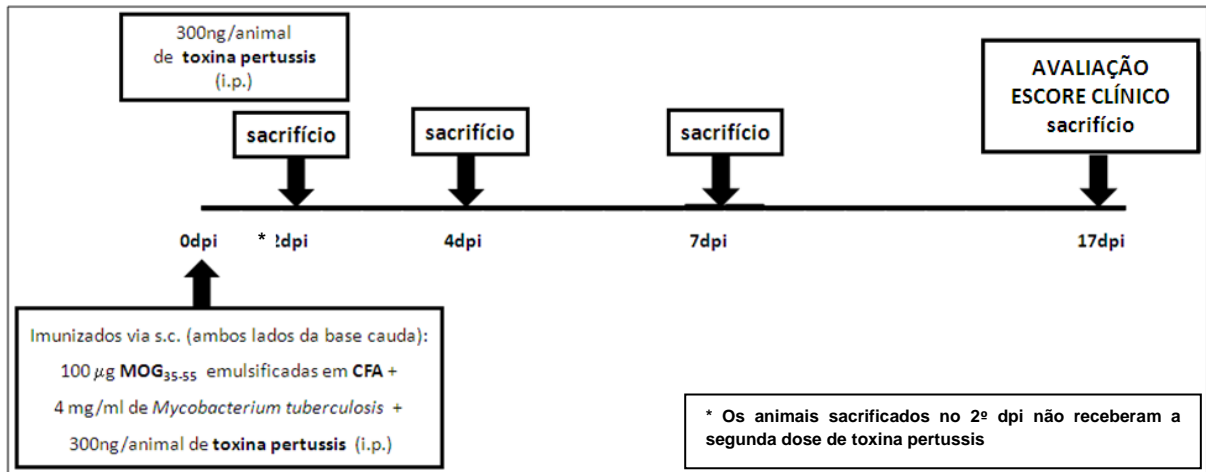


Figura 9. Representação esquemática do delineamento experimental (dpi = dias pós-indução).

4.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos em três grupos experimentais, como especificado a seguir: (a) Grupo controle, não imunizado; (b) Grupo MOG negativo (MOG-), imunizado com CFA + *M. tuberculosis* + toxina pertussis; (c) Grupo EAE, imunizado com MOG₃₅₋₅₅ + CFA + *M. tuberculosis* + toxina pertussis (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuição dos animais em grupos experimentais

Grupos/dias avaliados	Parâmetro avaliado (número de animais utilizados)		
	Controles	MOG-	EAE
2º dia pós-indução	Citocinas e Quimiocinas (4) Histologia (2)	Citocinas e Quimiocinas (9) Histologia (4)	Citocinas e Quimiocinas (9) Histologia (4)
4º dia pós-indução	Citocinas e Quimiocinas (4) Histologia (2) Citometria (10)	Citocinas e Quimiocinas (9) Histologia (4) Citometria (10)	Citocinas e Quimiocinas (9) Histologia (4) Citometria (10)
7º dia pós-indução	Citocinas e Quimiocinas (4) Histologia (2)	Citocinas e Quimiocinas (9) Histologia (4)	Citocinas e Quimiocinas (9) Histologia (4)

4.4 AVALIAÇÃO DO ESCORE CLÍNICO E MASSA CORPORAL

Vinte e um animais foram divididos entre os três grupos experimentais (07 animais/grupo) e tiveram seu escore clínico e massa corporais avaliados. A massa corporal dos animais foi determinada no dia zero e em todos os dias pós-indução, até o 17º dpi. A avaliação do escore clínico foi realizada do 2º até o 17º dpi, sendo que os animais foram clinicamente avaliados e classificados com relação à incapacidade neurológica através da escala apresentada na tabela 3, adaptada por De Paula e colaboradores (2008). O escore final de cada animal corresponde ao somatório da pontuação obtida em todos os parâmetros avaliados em um mesmo dia.

Tabela 3. Escala de incapacidade neurológica

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

^a Pontuação numérica estabelecida arbitrariamente

4.5 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DOS ÓRGÃOS E CÉLULAS

Foram realizados dois experimentos independentes, um para análise histológica e quantificação de citocinas e quimiocinas por ensaio imuno enzimático (ELISA) e outro para marcação extracelular e intracelular por Citometria de Fluxo. A eutanásia foi realizada com dose letal de Xilazina (10 mg/Kg) e Ketamina (150 mg/Kg) no 2º, 4º e 7º dia pós-indução. Após estarem completamente anestesiados, parte dos animais foram submetidos a perfusão cardíaca com uma solução de formalina a 4% para a retirada da medula espinhal para a análise histológica. Os outros animais foram perfundidos no ventrículo esquerdo com solução tampão fosfato (PBS) para a retirada dos linfonodos inguinais e da medula espinhal para a quantificação de citocinas e quimiocinas por ELISA, os tecidos retirados foram rapidamente armazenados em freezer -80°C. Em outro experimento, medula espinhal e linfonodos inguinais destinados a citometria de fluxo foram coletados e imediatamente processados para separação das células da medula espinhal e linfonodos inguinais e estas foram submetidas aos protocolos de marcação extracelular e intracelular.

4.6 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS POR ELISA

Para a avaliação dos níveis de citocinas e quimiocinas, porções dos órgãos (linfonodos inguinais e medula espinhal) congelados a -80°C foram descongelados e a medula espinhal foi macerada em tampão de extração de citocinas (100mg/mL) composto de: 0,4 M de cloreto de sódio (NaCl) (Isofar Indústria e Comércio), 0,05% de tween 20 (Isofar Indústria e Comércio), 0,5% de albumina de soro bovino (BSA) (Sigma), 0,1 M de fluoreto de fenil-metil-sulfonil (Sigma), 0,1 M de cloreto de benzetônio (Sigma), 10 mM de ácido etileno diamino tetracético (EDTA) (Sigma) e 20 pM de aprotinina (Sigma). Em seguida, os homogenatos foram centrifugados a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C e os sobrenadantes foram coletados e congelados a -80°C. As concentrações de citocinas IL-6, IL-12, IL-1β, TNF-α, IFN-γ, IL-17, IL-10,

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

4.7 ISOLAMENTO E PREPARAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DOS LINFONODOS INGUINAIS E MEDULA ESPINHAL

Os linfonodos inguinais e a medula espinhal coletado no 4º dpi, para realização da citometria de fluxo, foram macerados em meio RPMI-1640 com 10% de SFB. O macerado foi passado por um filtro de 70 μ m (BD Biosciences, Bedford, USA). As células da medula espinhal foram posteriormente incubadas com RPMI contendo 2mg de colagenase D (Roche, Mannheim, Germany) a 37°C por 45 minutos, submetidas a uma constante agitação. As células mononucleares da medula espinhal foram separadas por gradiente de Percoll e submetidas a uma lavagem com solução de PBS, 1% SFB e 0.09% de azida sódica, conforme descrito por Blacon e colaboradores (2008). A seguir as células foram lavadas em solução de ACK, centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos e resuspensas em PBS, 1% de SFB e 0.09% de azida sódica.

4.8 AVALIAÇÃO DOS MARCADORES CELULARES E CITOCINAS INTRACITOPLASMÁTICAS POR CITOMETRIA DE FLUXO

Células isoladas dos linfonodos inguinais e medula espinhal foram incubadas com anticorpos anti-camundongo CD3-proteína clorofil peridina (PerCP), anti-camundongo CD4-PerCP, F4/80 (PerCP), anti-camundongo CD11b-ficoeritrina (PE) (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA), anti-camundongo TLR-4-PE, anti-camundongo MHC classe II I-AD-alofofocianina (apc) (eBioscience, San Diego, USA), anti-camundongo CD11c-FITC, (eBioscience, 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-camundongo IFN- γ - PE-Cy-7, anti-camundongo IL-10-PE, anti-camundongo IL-17A-Alexa Fluor 488, anti-camundongo Foxp3-Alexa Fluor 488 (BD Biosciences PharMingen, San Diego, USA), anti-camundongo TLR-3-PE, anti-camundongo TLR-9-PE (IMGENEX, San Diego, USA). A captura das células foi feita utilizando-se o citômetro de fluxo FACScalibur® (Becton Dickinson, EUA) e as análises realizadas com *FCS Express version 3*.

4.9 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Medulas espinhais foram coletadas para análise histológica nos dias 2, 4 e 7 pós-indução. Os órgãos foram fixados em solução de formol tamponado 4%, posteriormente foram seccionados em cortes frontais e incluídos em parafina. Após a inclusão, foram realizados cortes frontais de 5 μ m de espessura para a montagem em lâmina. O processo de coloração em hematoxilina-eosina (H&E) iniciou-se com a imersão das lâminas em xilol I, II e III, durante 5 minutos para a desparafinização. Em seguida, estas lâminas foram imersas durante 3 minutos em banhos de álcool absoluto, álcool 95%, álcool 80%, álcool 70% e água destilada por 5 minutos para a

hidratação. Após a hidratação, as lâminas foram imersas no corante específico, seguindo as exigências da técnica de H&E para a avaliação do infiltrado celular. As lâminas foram imersas em Hematoxilina (corante ácido) por dois minutos, em seguida lavadas em água corrente por quatro minutos e imersas em água destilada por 2 minutos. Finalizada esta etapa, as lâminas foram imersas no corante eosina (corante básico), por 1 minuto. Logo após, as lâminas foram desidratadas, sendo imersas na bateria de álcool 70%, álcool 80%, álcool 95% e álcool absoluto e xilol IV, V e VI. Posteriormente, as lâminas foram montadas com meio de montagem Erv-Mount (EasyPath, Erviegas, São Paulo, SP) entre lâminas e lamínulas. As imagens foram obtidas usando o microscópio Olympus BX51 e os resultados foram registrados pelo software Image Pro plus (Media Cybernetics TM).

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software Graph Pad Prism 5.0 (GraphPad Software, EUA). Os resultados apresentados nos testes são provenientes de dois experimentos independentes e foram representados pela média \pm erro-padrão. As variáveis numéricas foram avaliadas nos diferentes grupos pelo teste de normalidade de Kolgomorov-Smirnov para distribuição gaussiana dos dados. Foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney para determinação das diferenças significativas entre os grupos de camundongos, com nível de significância menor que 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DO ESCORE CLÍNICO E MASSA CORPORAL

Após a indução do modelo de EAE em camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 o curso clínico da EAE e a massa corporal de 07 animais/grupo foram acompanhados diariamente durante 17 dias pós-indução. Para os grupos controle não imunizado e MOG- não foi observado nenhum sinal clínico da EAE, durante todo o período avaliado. Por outro lado, todos os animais do grupo EAE desenvolveram sinais clínicos, sendo o 10º dia pós-indução o início dos sinais clínicos da doença. O pico máximo de pontuação clínica ocorreu no 15º dia pós-indução e a média da pontuação do escore clínico durante o pico foi 5.86 ± 0.56 (Figura 10A). Em paralelo ao agravamento dos sinais clínicos da EAE foi observada perda acentuada da massa corporal nos animais do grupo EAE quando comparados aos animais do grupo controle não imunizado entre os dias 12 e 17 pós-indução ($p < 0,05$) (Figura 10B).

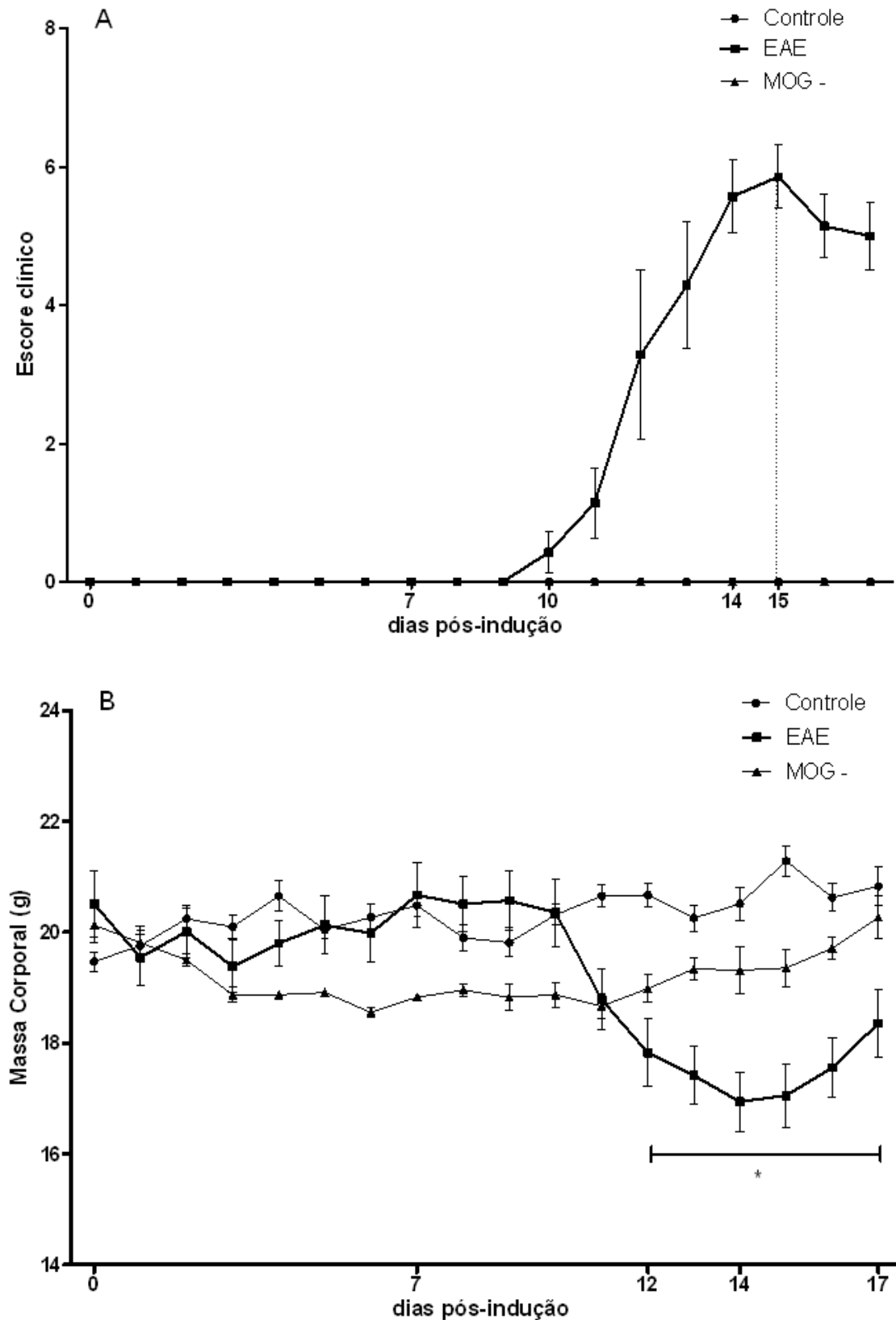


Figura 10. Média do escore clínico e massa corporal. Escore clínico (A) e Massa corporal (B) de camundongos C57BL/6 imunizados com CFA + *M. tuberculosis* (grupo MOG -), imunizados com 100µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ + CFA + *M. tuberculosis* (grupo EAE), ou não imunizados (grupo controle) (n=7 por grupo). A massa corporal foi registrada do dia 0 ao 17º dpi; e os sinais clínicos foram registrados do 2º ao 17º dpi. Cada ponto representa a média±erro padrão. * = p<0,05 versus o grupo controle não imunizado.

5.2 AVALIAÇÃO DO NÚMERO ABSOLUTO DE CÉLULAS MHCII⁺F4/80⁺CD11c⁺ EXPRESSANDO TLR NOS LINFONODOS INGUINAIS

Os grupos MOG- e EAE apresentaram maior número de células MHCII⁺F4/80⁺CD11c⁺, isoladas dos linfonodos inguinais, expressando TLR3 e TLR4 em relação ao controle não imunizado. Não ocorreu diferença significativa entre os grupos MOG- e EAE no número de células MHCII⁺F4/80⁺CD11c⁺ expressando TLR3, TLR4 e TLR9 (Figura 11A, 11B, 11C).

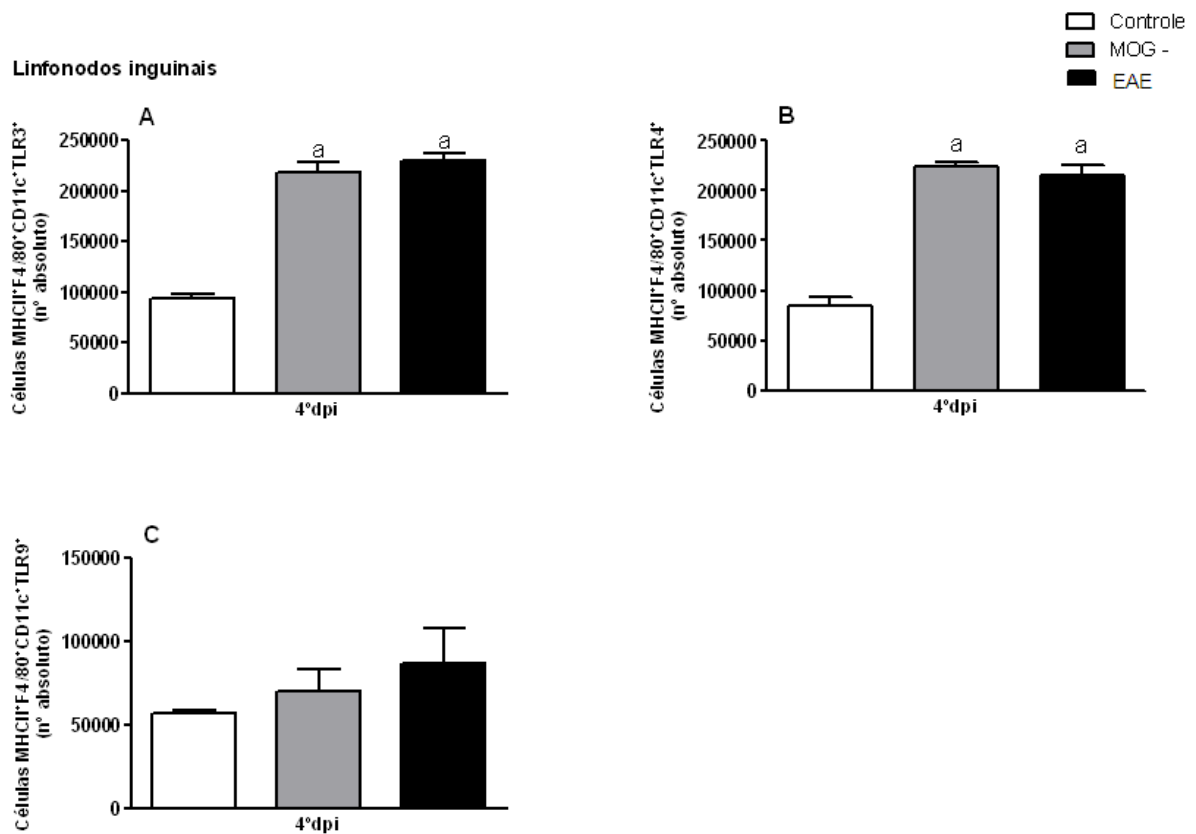


Figura 11. Número absoluto de células MHCII⁺F4/80⁺CD11c⁺ expressando TLR3(A) TLR4(B) e TLR9 (C) determinada por citometria de fluxo de células mononucleares isoladas dos linfonodos inguinais (n=10 animais por grupo), no 4º dia pós-indução dos camundongos C57BL/6 imunizados com CFA + *M. tuberculosis* (grupo MOG -), imunizados com 100µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ + CFA + *M. tuberculosis* (grupo EAE), ou não imunizados (grupo controle). Cada barra representa a média aritmética ± SEM. a = p<0,05 versus o grupo controle.

5.3 AVALIAÇÃO DO NÚMERO ABSOLUTO DE CÉLULAS MHCII⁺F4/80⁺CD11c⁺ EXPRESSANDO TLR NA MEDULA ESPINHAL

O grupo EAE apresentou maior número de células MHCII⁺F4/80⁺CD11c⁺ isoladas da medula espinhal expressando TLR3, TLR4 e TLR9 em relação ao grupo MOG- e em relação ao controle não imunizado (Figuras 12A, 12B, 12C).

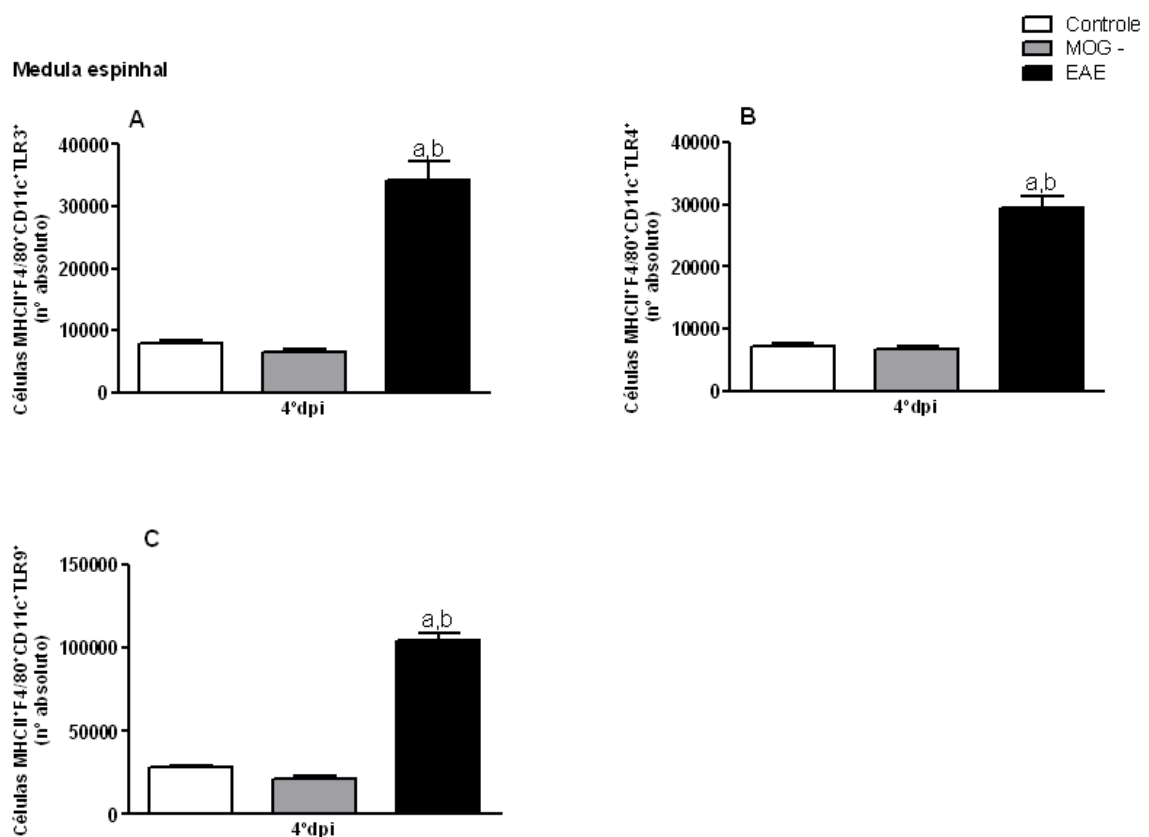


Figura 12 Número absoluto de células MHCII⁺F4/80⁺CD11c⁺ expressando TLR3(A) TLR4 (B) e TLR9 (C) determinada por citometria de fluxo de células mononucleares isoladas da medula espinhal (n=10 animais por grupo), no 4º dia pós-indução dos camundongos C57BL/6 imunizados com CFA + *M. tuberculosis* (grupo MOG-), imunizados com 100µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ + CFA + *M. tuberculosis* (grupo EAE), ou não imunizados (grupo controle). Cada barra representa a média aritmética ± SEM. a = p<0,05 versus o grupo controle; b = p<0,05 versus o grupo MOG-.

5.4 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DAS CITOCINAS INFLAMATÓRIAS IL-6, IL-12, IL-1 β e TNF- α EM HOMOGENATO DE LINFONODOS INGUINAIS

Os níveis de IL-6 nos linfonodos inguinais foram elevados no 4º e 7º dpi do grupo MOG- e 2º, 4º e 7º dpi do grupo EAE em relação ao controle não imunizado, enquanto que no 2º dpi do grupo MOG- os níveis de IL-6 foram reduzidos em relação ao controle não imunizado. Além disso, no grupo EAE os níveis de IL-6 foram maiores no 4º e 7º dpi em relação ao 2º dpi (Figura 13A).

O nível de IL-12 foi maior no 4º e 7º dpi no grupo MOG- e no grupo EAE em relação ao grupo controle não imunizado. No grupo EAE a produção de IL-12 foi maior no 4º e 7º dpi em relação ao 2º dpi (Figura 13B).

A concentração de IL-1 β nos grupos MOG- e EAE foram maiores no 2º, 4º e 7º dpi em relação ao grupo controle não imunizado. Além disso, no grupo EAE os níveis de IL-1 β foram maiores no 4º e 7º dpi em relação ao 2º dpi (Figura 13C).

O TNF- α apresentou-se elevado no grupo MOG- no 2º, 4º e 7º dpi e no grupo EAE no 4º e 7º dpi em relação ao controle não imunizado. A produção de TNF- α foi elevada no 2º, 4º e 7º dpi no grupo MOG- em relação ao grupo EAE. O grupo EAE também apresentou níveis de TNF- α maiores no 7º dpi em relação ao 2º e 4º dpi (Figura 13D).

De uma maneira geral, nos órgãos periféricos, não houve diferenças significativas entre os grupos MOG- e EAE em relação à produção das citocinas inflamatórias IL-6, IL-12 e IL-1 β . Somente os níveis de TNF- α mostraram-se elevados no grupo MOG- em relação ao grupo EAE, em todos os pontos analisados.

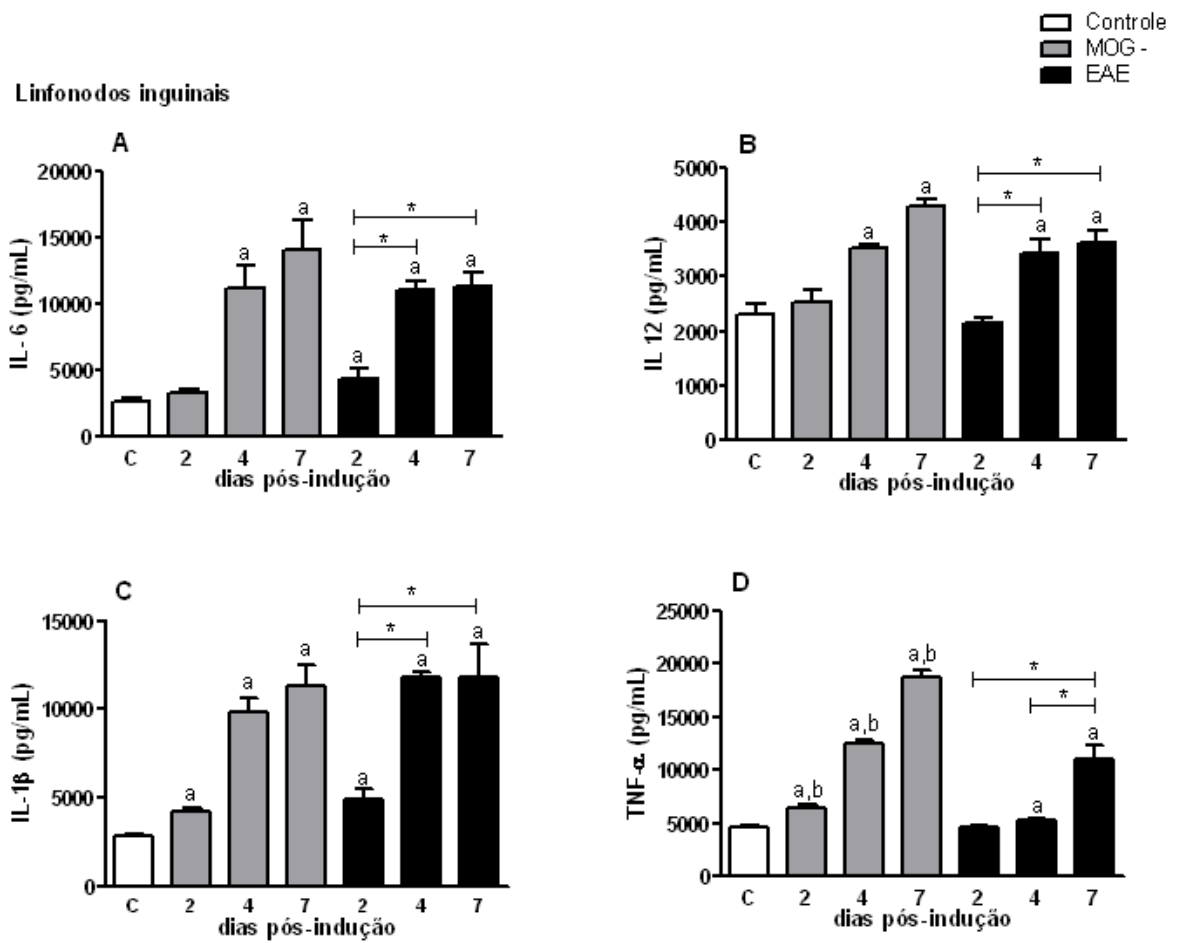


Figura 13. Níveis de citocinas IL-6 (A), IL-12 (B), IL-1 β (C) e TNF- α (D) no homogenato linfonodos inguinais de camundongos C57BL/6 imunizados com CFA + *M. tuberculosis* (grupo MOG-), imunizados com 100 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ + CFA + *M. tuberculosis* (grupo EAE), ou não imunizados (grupo controle) (n=9 animais por grupo e n=4 animais para grupo controle não imunizado), avaliadas por ELISA, nos dias 2, 4 e 7 pós-indução. Cada barra representa a média aritmética \pm SEM. **a** = $p < 0,05$ versus o grupo controle; **b** = $p < 0,05$ quando comparado ao mesmo dia do grupo EAE; * = $p < 0,05$ entre os dados comparados.

5.5 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DAS CITOCINAS INFLAMATÓRIAS IL-6, IL-12, IL-1 β e TNF- α EM HOMOGENATO DE MEDULA ESPINHAL

A concentração de IL-6 no homogenato de medula foi elevada no 2º dpi do grupo MOG- e 2º, 4º e 7º dpi do grupo EAE em relação ao controle não imunizado. O grupo EAE apresentou níveis elevados de IL-6 no 4º e 7º dpi em relação ao grupo MOG-. Além disso, no grupo EAE os níveis de IL-6 foram maiores no 4º e 7º dpi em relação ao 2º dpi (Figura 14A).

A concentração de IL-12 estava elevada no grupo MOG- no 2º dpi e no grupo EAE no 7º dpi em relação ao grupo controle não imunizado. Os níveis de IL-12 também estavam elevados no 7º dpi do grupo EAE em relação ao 7º dpi do grupo MOG-. Além disso, no grupo EAE os níveis de IL-12 foram maiores no 7º dpi em relação ao 2º e 4º dpi (Figura 14B).

A citocina IL-1 β estava elevada no grupo MOG- no 2º, 4º e 7º dpi e no grupo EAE nos 4º e 7º dpi em relação ao grupo controle não imunizado. Os níveis de IL-1 β também estavam elevados nos 4º e 7º dpi do grupo EAE em relação ao 4º e 7º dpi do grupo MOG-. Além disso, no grupo EAE os níveis de IL-1 β foram maiores no 4º e 7º dpi em relação ao 2º (Figura 14C).

O TNF- α estava elevado no grupo EAE no 4º e 7º dpi em relação ao grupo controle não imunizado. Os níveis de TNF- α também estavam elevados no 7º dpi do grupo EAE em relação ao 7º dpi do grupo MOG-. Além disso, no grupo EAE a concentração de TNF- α foi mais elevada no 7º dpi em relação ao 2º e 4º dpi (Figura 14D).

Assim, de uma forma geral, no grupo EAE houve uma cinética no aumento destas citocinas inflamatórias no SNC, nos três pontos analisados, enquanto que no grupo MOG- houve uma produção menor e constante destas citocinas avaliadas.

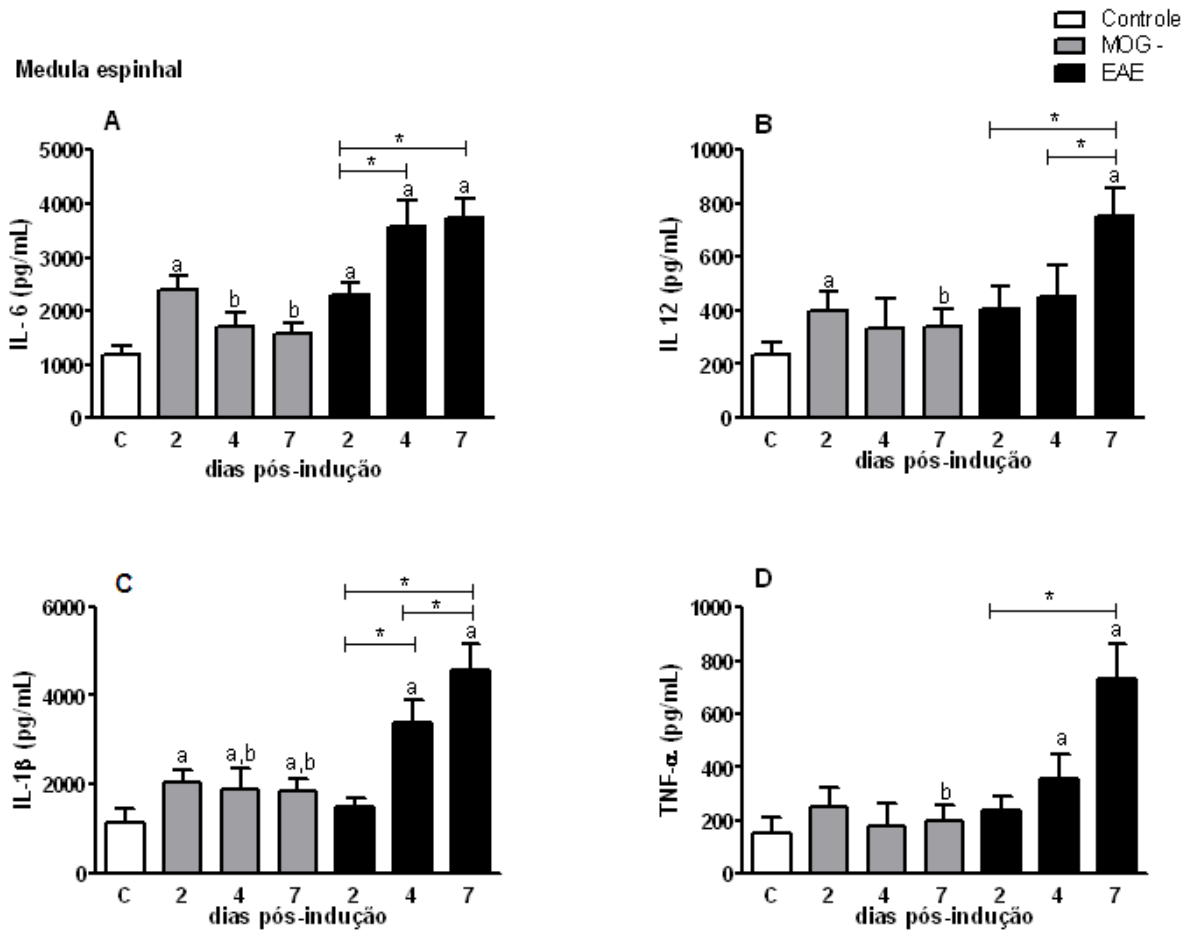


Figura 14. Níveis de citocinas IL-6 (A), IL-12 (B), IL-1 β (C) e TNF- α (D) no homogenato de medula espinhal de camundongos C57BL/6 imunizados com CFA + *M. tuberculosis* (grupo MOG-), imunizados com 100 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ + CFA + *M. tuberculosis* (grupo EAE), ou não imunizados (grupo controle) (n=9 animais por grupo e n=4 animais para grupo controle não imunizado), avaliadas por ELISA, nos dias 2,4 e 7 pós-indução. Cada barra representa a média aritmética \pm SEM. **a** = $p < 0,05$ versus o grupo controle; **b** = $p < 0,05$ quando comparado ao mesmo dia do grupo EAE; * = $p < 0,05$ entre os dados comparados.

5.6 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE QUIMIOCINAS CCL5 E CCL20 EM HOMOGENATO DE LINFONODOS INGUINAIS E MEDULA ESPINHAL

Foi observado nos linfonodos inguinais aumento de CCL5 nos grupos MOG- e EAE nos 2º, 4º e 7º dpi em relação ao grupo controle não imunizado. A dosagem de CCL5 foi mais elevada no grupo MOG- em relação ao grupo EAE no 2º, 4º e 7º dpi. Além disso, grupo EAE apresentou níveis mais elevados no 7º dpi em relação ao 4º dpi. A dosagem de CCL20 foi elevada nos grupos MOG- e EAE no 2º, 4º e 7º dpi em relação ao controle não imunizado. O grupo MOG- apresentou níveis elevados de CCL20 em relação ao grupo EAE no 2º, 4º e 7º dpi e o grupo EAE apresentou tendência ao aumento do 2º para 7º dpi ($p < 0.05$) (15A, 15B).

A dosagem de CCL5 no homogenato de medula espinhal foi elevada no grupo EAE no 4º e 7º dpi em relação ao grupo controle não imunizado. Ocorreu aumento no nível CCL5 nos 4º e 7º dpi do grupo EAE em relação ao grupo MOG-. No grupo EAE o nível CCL5 foi maior no 4º e 7º dpi em relação ao 2º dpi. Enquanto que dosagem de CCL20 foi elevada no grupo EAE no 4º e 7º dpi em relação ao grupo controle não imunizado. No grupo EAE o nível de CCL20 foi maior nos 4º e 7º dpi em relação ao grupo MOG-. Dentro do grupo EAE o nível de CCL20 foi maior no 4º e 7º dpi em relação ao 2º dpi ($p < 0.05$) (Figura 15C, 15D).

Assim, podemos dizer que enquanto nos linfonodos inguinais houve aumento gradativo de CCL20 durante a cinética de evolução do modelo, tanto no grupo EAE quanto no grupo MOG-, na medula espinhal do grupo EAE houve um pico de produção de CCL5 e CCL20 no 4º dpi.

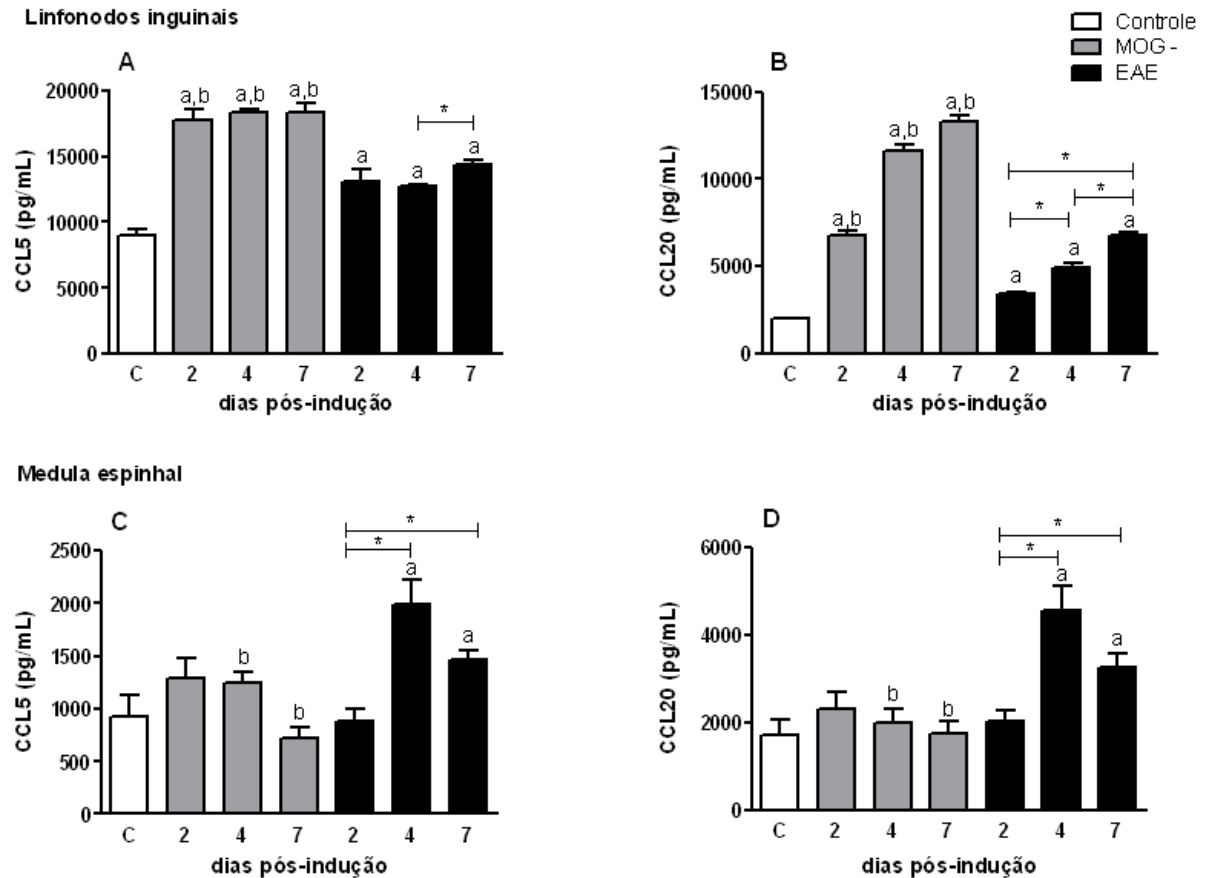


Figura 15. Níveis de quimiocinas CCL5 e CCL20 no homogenato de linfonodos inguinais (A, B) e medula espinhal (C, D) de camundongos C57BL/6 imunizados com CFA + *M. tuberculosis* (grupo MOG-), imunizados com 100µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ + CFA + *M. tuberculosis* (grupo EAE), ou não imunizados (grupo controle) (n=9 animais por grupo e n=4 animais para grupo controle não imunizado), avaliadas por ELISA, nos dias 2,4 e 7 pós-indução. Cada barra representa a média aritmética ± SEM. **a** = p<0,05 versus o grupo controle; **b** = p<0,05 quando comparado ao mesmo dia do grupo EAE; * = p<0,05 entre os dados comparados.

5.7 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA MEDULA ESPINHAL

Cortes histológicos da medula espinhal, corados por H&E, dos animais do grupo controle, grupo MOG- e grupo EAE nos dias 2, 4 e 7 pós-indução, foram analisados. Os animais do grupo controle, não imunizado, apresentaram padrão parenquimatoso habitual na medula espinhal. Inicialmente no 2º e 4º dpi não foi observado presença de infiltrado inflamatório em ambos os grupos MOG- e EAE em relação ao grupo controle. Entretanto, no 7º dpi foi possível observar intenso infiltrado inflamatório na região meningeal, estendendo-se pelo parênquima do tecido nos animais EAE em relação ao grupo MOG- e grupo controle (Figura 16).

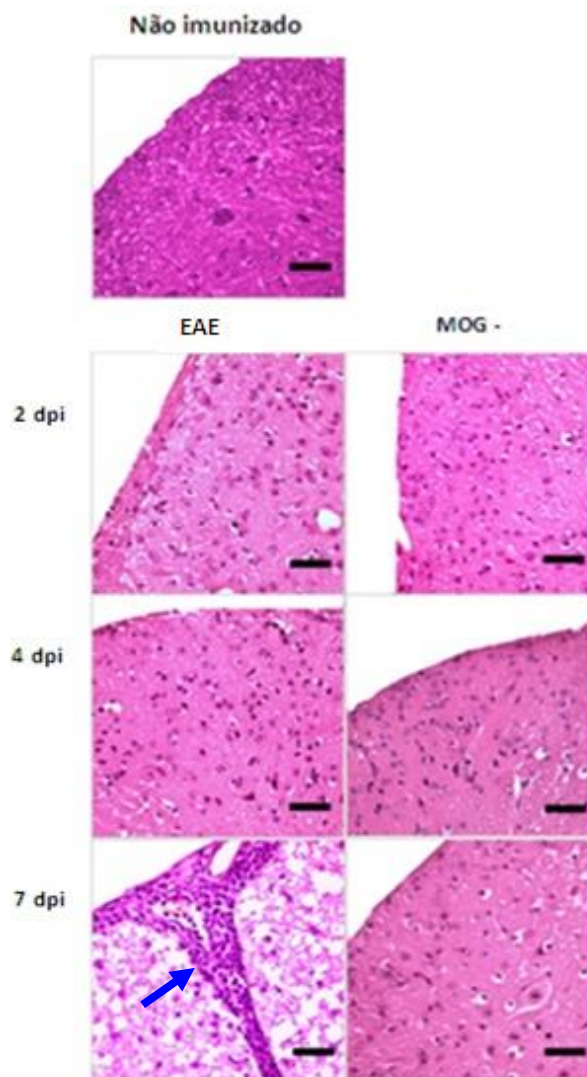


Figura 16. Análise histológica das amostras de medula espinhal, corados por H&E, de camundongos C57BL/6 imunizados com CFA+ *M. tuberculosis* (grupo MOG-), imunizados com 100µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅+ CFA+ *M. tuberculosis* (grupo EAE) ou não imunizado (grupo controle), (n=4 animais por grupo). Presença de infiltrado inflamatório (seta azul). As figuras são representativas da análise histológica de cada grupo experimental (Magnificação de 20x, escala de barra= 30 µm).

5.8 AVALIAÇÃO DO NÚMERO ABSOLUTO DE CÉLULAS CD11c⁺ E CÉLULAS CD11b⁺ PRODUZINDO IFN- γ NOS LINFONODOS INGUINAIS E MEDULA ESPINHAL

Ocorreu maior produção de IFN- γ por células CD11c⁺ e células CD11b⁺ isoladas dos linfonodos inguinais no grupo EAE em relação ao grupo MOG- e em relação ao grupo controle não imunizado (Figuras 17A, 17B).

Ocorreu também, maior produção IFN- γ por células CD11c⁺ e células CD11b⁺ isoladas da medula espinhal no grupo EAE em relação ao grupo MOG- e em relação ao grupo controle não imunizado (Figura 17C, 17D).

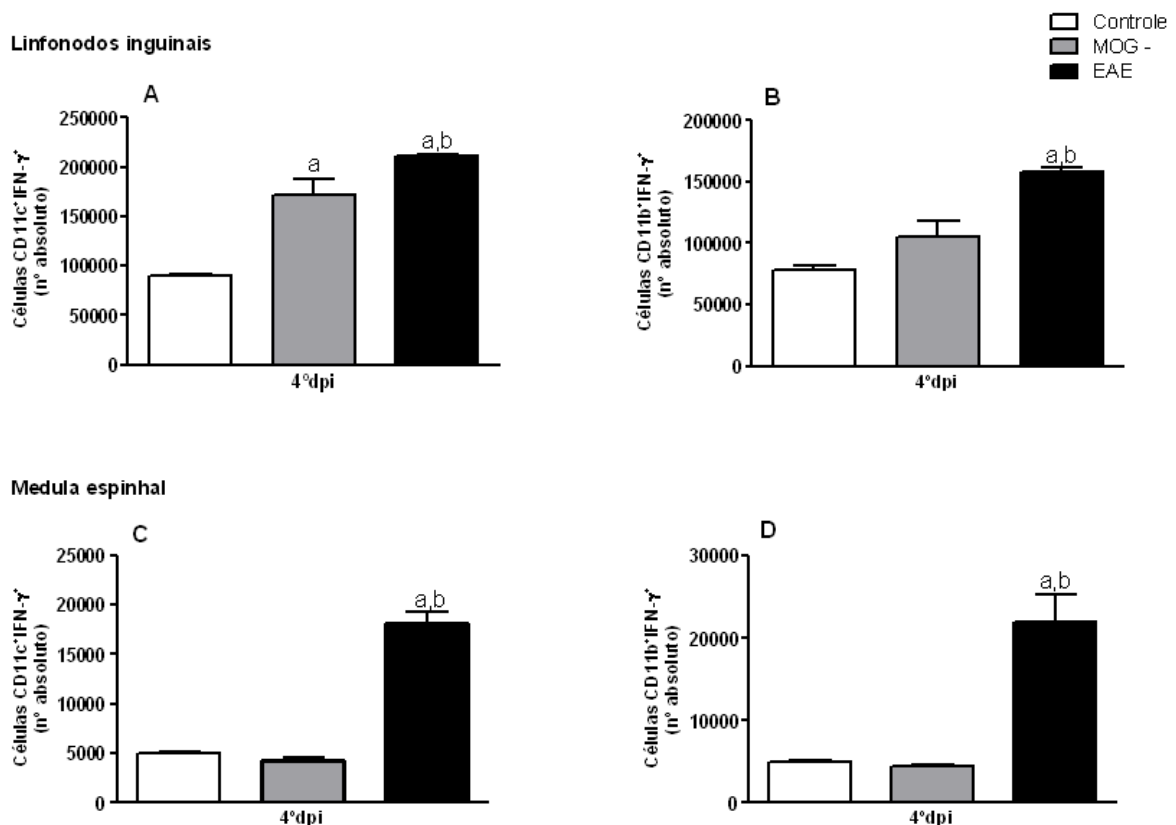


Figura 17. Número absoluto de células CD11c⁺ e células CD11b⁺ produzindo IFN- γ , determinada por citometria de fluxo de células mononucleares isoladas dos linfonodos inguinais (A,B) e medula espinhal (C,D) (n=10 animais por grupo), no 4º dia pós-indução dos camundongos C57BL/6 imunizados com CFA + *M. tuberculosis* (grupo MOG-), imunizados com 100 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ + CFA + *M. tuberculosis* (grupo EAE), ou não imunizados (grupo controle). Cada barra representa a média aritmética \pm SEM. a = p < 0,05 versus o grupo controle; b = p < 0,05 versus o grupo MOG-.

5.9 AVALIAÇÃO DO NÚMERO ABSOLUTO DE CÉLULAS MHCII⁺F4/80⁺CD11c⁺ PRODUZINDO IL-10 NOS LINFONODOS INGUINAIS E MEDULA ESPINHAL

Ocorreu maior produção de IL-10 por células MHCII⁺F4/80⁺CD11c⁺ isoladas dos linfonodos inguinais no grupo MOG- em relação ao grupo EAE (Figura 18A).

Em relação às células isoladas da medula espinhal, ocorreu maior produção IL-10 por células MHCII⁺F4/80⁺CD11c⁺ no grupo EAE em relação ao grupo MOG- e em relação ao controle não imunizado (Figura 18B).

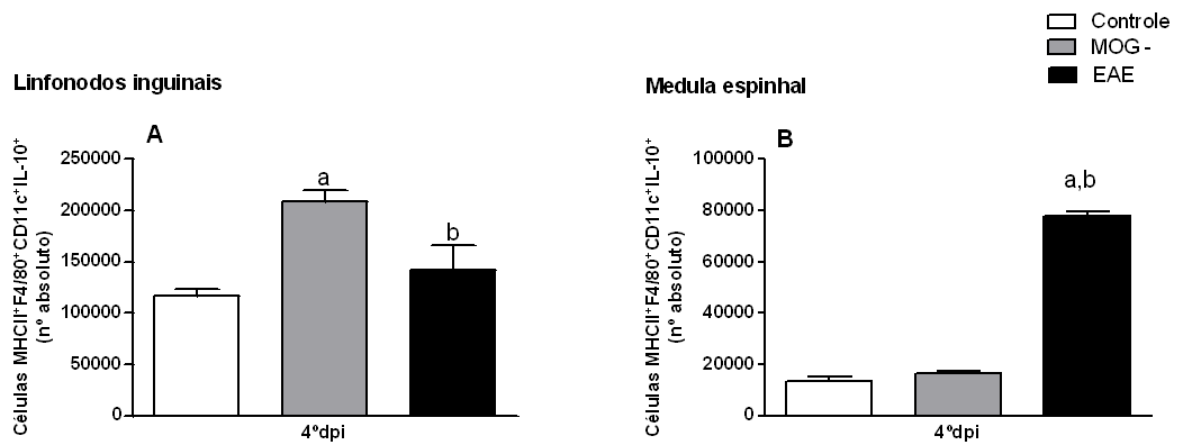


Figura 18. Número absoluto de células MHCII⁺F4/80⁺CD11c⁺ produzindo IL-10 determinada por citometria de fluxo de células mononucleares isoladas dos linfonodos inguinais (A) e medula espinhal (B) (n=10 animais por grupo), no 4º dia pós-indução dos camundongos C57BL/6 imunizados com CFA + *M. tuberculosis* (grupo MOG-), imunizados com 100µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ + CFA + *M. tuberculosis* (grupo EAE), ou não imunizados (grupo controle) Cada barra representa a média aritmética ± SEM. **a** = p<0,05 versus o grupo controle; **b** = p<0,05 versus o grupo MOG-.

5.10 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS IFN- γ e IL-17 EM HOMOGENATO DE LINFONODOS INGUINAIS E MEDULA ESPINHAL

Nos linfonodos inguinais dos animais do grupo MOG- ocorreu aumento de IFN- γ no 4º e 7º dpi para o grupo EAE, este aumento foi verificado no 2º e 7º dpi em relação controle não imunizado. O grupo EAE apresentou níveis elevados de IFN- γ no 2º dpi em relação ao grupo MOG-. No grupo EAE, no 2º e 7º dpi, o nível de IFN- γ foi maior que no 4º dpi. A concentração de IL-17 foi elevada no 2º, 4º e 7º dpi no grupo MOG- e no 4º e 7º dpi no grupo EAE em relação ao controle não imunizado. O grupo MOG- apresentou níveis elevados de IL-17 no 2º, 4º e 7º dpi em relação ao grupo EAE. Além disso, no grupo EAE os níveis de IL-17 foram maiores no 4º e 7º dpi em relação ao 2º dpi (Figuras 19A, 19B).

Os níveis de IFN- γ na medula espinhal dos animais no grupo EAE foram elevados no 4º e 7º dpi, em relação ao controle não imunizado. O grupo EAE também apresentou níveis elevados de IFN- γ , no 4º e 7º dpi em relação ao grupo MOG-. Além disso, no grupo EAE os níveis de IFN- γ foram maiores no 4º e 7º dpi em relação ao 2º dpi. Na avaliação da concentração de IL-17 na medula espinhal foi possível observar que os níveis de IL-17 foram elevados no 4º e 7º dpi no grupo EAE em relação ao controle não imunizado. O grupo EAE apresentou níveis elevados de IL-17 no 7º dpi em relação ao grupo MOG-. Além disso, no grupo EAE os níveis de IL-17 foram maiores no 4º e 7º dpi em relação ao 2º dpi (Figuras 19C, 19D).

Assim, nos linfonodos inguinais os níveis de IFN- γ foram elevados tanto no grupo MOG- quanto no grupo EAE e a citocina IL-17 apresentou-se elevada no grupo MOG- em relação ao grupo EAE. Na medula espinhal este padrão foi diferente: os níveis de IFN- γ e IL-17, de uma forma geral, foram maiores no grupo EAE, quando comparados com o grupo MOG-.

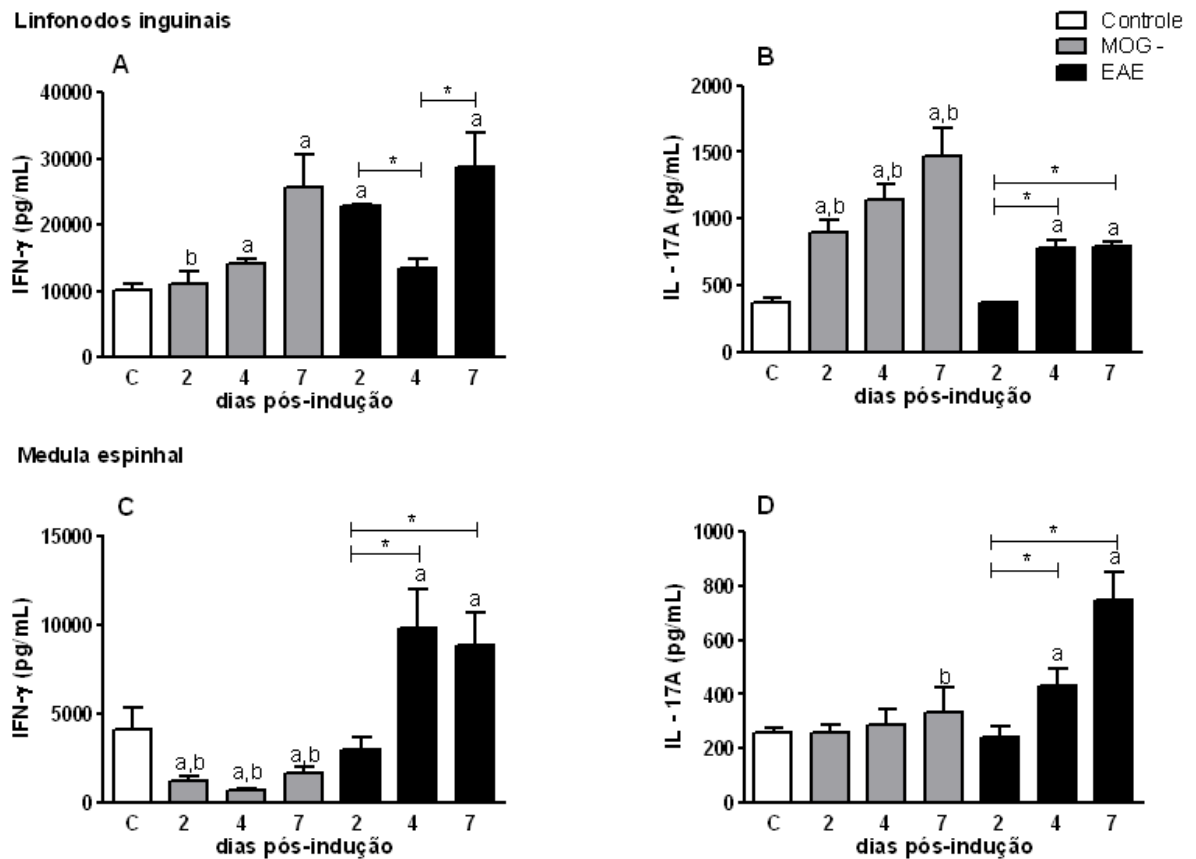


Figura 19. Níveis de citocinas IFN- γ e IL-17 no homogenato de linfonodos inguinais (A, B) e medula espinhal (C, D) de camundongos C57BL/6 imunizados com CFA + *M. tuberculosis* (grupo MOG-), imunizados com 100 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ + CFA + *M. tuberculosis* (grupo EAE), ou não imunizados (grupo controle) (n=9 animais por grupo e n=4 animais para grupo controle não imunizado), avaliadas por ELISA, nos dias 2,4 e 7 pós-indução. Cada barra representa a média aritmética \pm SEM. **a** = p<0,05 versus o grupo controle; **b** = p<0,05 quando comparado ao mesmo dia do grupo EAE; * = p<0,05 entre os dados comparados.

5.11 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DAS CITOCINAS ANTI-INFLAMATÓRIAS IL-10 e TGF- β EM HOMOGENATO DE LINFONODOS INGUINAIS E MEDULA ESPINHAL

A concentração de IL-10 nos linfonodos inguinais foi elevada no 2º, 4º e 7º dpi no grupo MOG- e no 7º dpi no grupo EAE em relação ao controle não imunizado. O grupo MOG- apresentou níveis elevados de IL-10 no 2º, 4º e 7º dpi em relação ao grupo EAE. Além disso, no grupo EAE os níveis de IL-10 foram maiores no 7º dpi em relação ao 2º e 4º dpi. A citocina TGF- β apresentou-se elevada no 2º, 4º e 7º dpi no grupo MOG- e no 7º dpi no grupo EAE em relação ao controle não imunizado. O grupo MOG- apresentou níveis elevados de TGF- β no 2º, 4º e 7º dpi em relação ao grupo EAE. Além disso, no grupo EAE os níveis de TGF- β foram maiores no 7º dpi em relação ao 2º e 4º dpi (Figura 20A, 20B).

A determinação da concentração citocina IL-10 em homogenato de medula espinhal mostrou-se elevada no 2º, 4º e 7º dpi no grupo EAE em relação ao controle não imunizado. O grupo EAE apresentou níveis elevados de IL-10 no 4º e 7º dpi em relação ao grupo MOG-. Além disso, no grupo EAE os níveis de IL-10 foram maiores no 4º e 7º dpi em relação ao 2º dpi. O TGF- β , na medula espinhal, apresentou-se elevado no 2º, 4º e 7º dpi no grupo EAE em relação ao controle não imunizado. O grupo EAE apresentou níveis elevados de TGF- β no 2º, 4º e 7º dpi em relação ao grupo MOG- (Figura 20C, 20D).

Assim, de uma maneira geral, na periferia o grupo MOG- apresentou níveis elevados das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β em relação ao grupo EAE. No SNC este padrão se inverteu, os níveis de IL-10 e TGF- β foram maiores no grupo EAE em relação ao grupo MOG-.

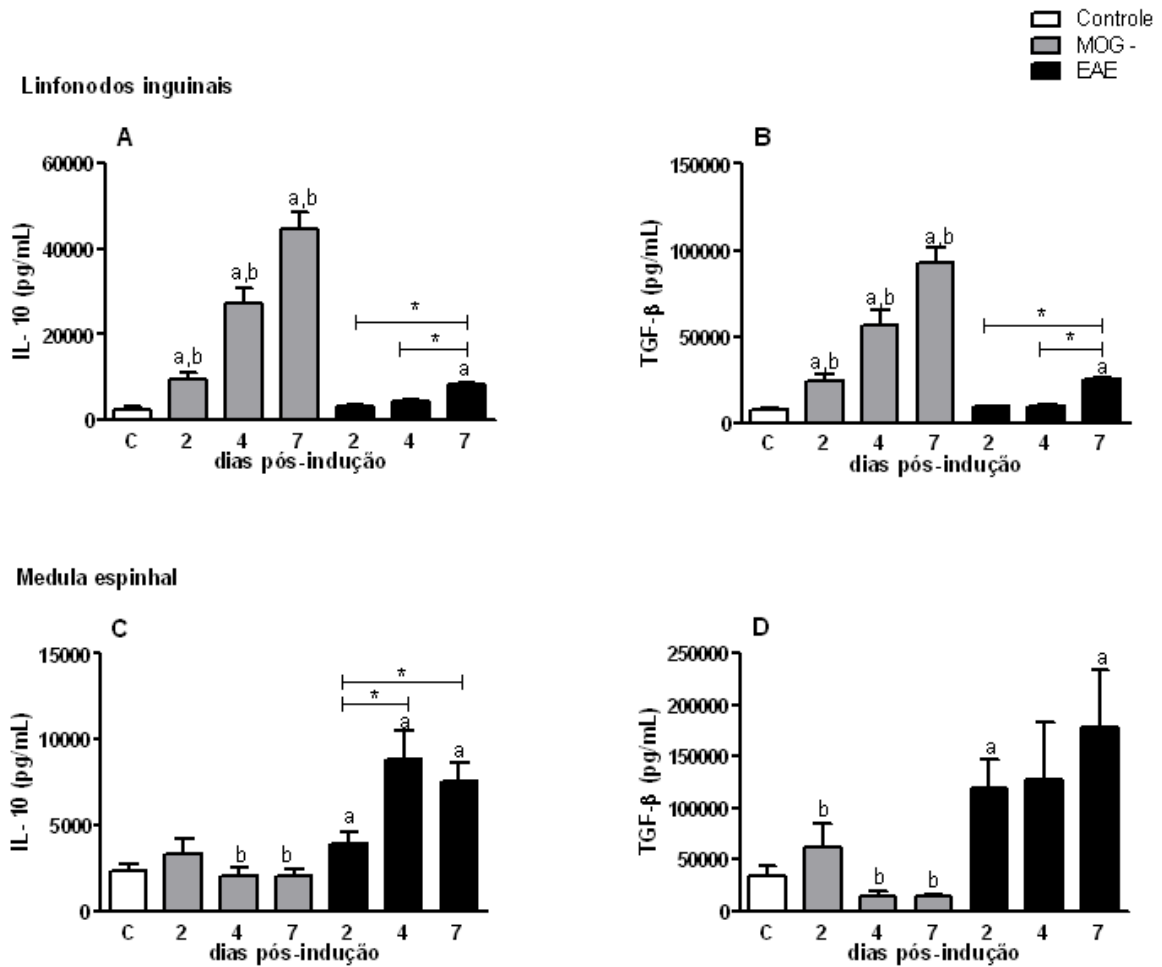


Figura 20. Níveis de citocinas IL-10 e TGF- β no homogenato de linfonodos inguinais (A, B) e medula espinhal (C, D) de camundongos C57BL/6 imunizados com CFA + *M. tuberculosis* (grupo MOG-), imunizados com 100 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ + CFA + *M. tuberculosis* (grupo EAE), ou não imunizados (grupo controle) (n=9 animais por grupo e n=4 animais para grupo controle não imunizado), avaliadas por ELISA, nos dias 2,4 e 7 pós-indução. Cada barra representa a média aritmética \pm SEM. **a** = $p < 0,05$ versus o grupo controle; **b** = $p < 0,05$ quando comparado ao mesmo dia do grupo EAE; * = $p < 0,05$ entre os dados comparados

6 DISCUSSÃO

A EM é uma doença crônica do SNC caracterizada por inflamação, desmielinização e degeneração axonal progressiva (ANDERSON et al., 1992). Sua etiologia ainda permanece desconhecida (WEINER, 2008), mas estudos relatam que fatores ambientais incluindo patógenos, podem contribuir para o desenvolvimento da doença (SADOVNICK e EBERS, 1993; WUCHERPFENING e STROMINGER, 1995; BASSO et al., 2008). Sendo a imunidade inata a primeira linha de defesa do hospedeiro contra estas infecções patogênicas (MODLIN, 2012), o presente trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar esta resposta imune, ou seja, a fase inicial da EAE. Analisando os dados do presente estudo nos pontos iniciais (2º, 4º e 7º dpi), não se observou pontuação do escore clínico, que teve início somente a partir do 10º dpi, porém, houve diferenças significativas quanto à produção de citocinas, quimiocinas e à expressão de marcadores celulares nos grupos MOG- e EAE em relação ao grupo controle, o que poderia levar a ativação de células pró-inflamatórias tanto na periferia quanto no SNC, sugerindo que a presença do adjuvante foi suficiente para aumentar a concentração dos mediadores inflamatórios, em ambos os grupos.

A EAE é tradicionalmente induzida em roedores utilizando a combinação do adjuvante CFA e neuroantígenos (GOLD, LININGTON e LASSMANN, 2006). O presente trabalho utilizou o modelo em camundongos C57Bl/6 induzidos com o peptídeo MOG₃₅₋₅₅ e CFA, este suplementado com *M. tuberculosis* e toxina pertussis. Foi possível observar o aparecimento de sinais clínicos no grupo EAE e ausência dos mesmos no grupo MOG-, confirmando que a presença do peptídeo MOG leva ao influxo de células para o SNC, instalação do processo inflamatório e desmielinização. A ausência dos sinais clínicos da EAE no grupo MOG- confirma a existência de outros fatores, além dos ambientais, no desenvolvimento da EM. Demonstrando, portanto, a necessidade de interação destes elementos ambientais com os fatores genéticos no estabelecimento da doença (MARTA et al., 2008). Este fato já havia sido relatado no trabalho de Lublin (1982), ao demonstrar que ambos componentes, micobacterianos e toxina pertussis, foram requeridos para o desenvolvimento da doença, porém seguidos da imunização com antígenos específicos da mielina, sugerindo que não só a presença do agente infeccioso,

estimulando a resposta autoimune contra a mielina é necessária, mas também a presença do antígeno MOG₃₅₋₅₅ proveniente da mielina.

O CFA contém PAMPs, provenientes do *M. tuberculosis* e da toxina pertussis, que se ligam aos TLRs, necessários para induzir EAE (HANSEN et al., 2006). Após esta interação, as células da imunidade inata desempenham a função de APCs para os linfócitos T, desencadeando a produção de citocinas pró-inflamatórias (TAKEDA e AKIRA, 2005; HACKER et al., 2006). Os TLRs são expressos em uma variedade de tipos celulares na periferia e no SNC, incluindo macrófagos, células dendríticas, micróglia, astrócitos, neurônios e células vasculares cerebrais (BSIBSI et al., 2002; CARPENTIER et al., 2007 CARTY e BOWIE, 2011).

Estudos realizados por Marta e colaboradores (2008), revelaram elevada expressão dos TLRs durante a EAE, uma vez que estes receptores são expressos nas células do SNC eles podem influenciar no local da resposta imune. Do mesmo modo, Bsibsi e colaboradores (2002) e Andersson e colaboradores (2008) demonstraram que existe aumento na expressão destes TLRs nas células mononucleares do cérebro e medula espinhal em áreas de lesões da doença. Além disso, Marta e colaboradores (2008) também evidenciaram que a indução da EAE requer a via de sinalização MyD88, ao demonstrar que camundongos deficientes em MyD88 são mais resistentes a EAE, com diminuição da inflamação no SNC. Estes camundongos apresentaram redução da produção de IL-6 e IL-23 por células dendríticas e redução da produção de IFN- γ e IL-17 pelos linfócitos T, sugerindo que a resposta imune inata iniciada através dos TLRs é requerida para a indução da doença. Em conformidade com estes dados, o presente estudo obteve maior número de células mononucleares expressando os TLR3, 4 e 9 na medula espinhal dos animais do grupo EAE, o que pode ter sido importante para o aparecimento dos sinais clínicos da doença.

Embora muitos estudos já tenham demonstrado que a sinalização do TLR é necessária na EAE, o papel de cada receptor ainda é complexo, sendo que um mesmo receptor pode influenciar de maneira ambígua o desenvolvimento da EAE. Por exemplo, o TLR4, expresso nas APCs, reconhece o LPS presente no adjuvante e, conseqüentemente, induz a resposta Th1, promovendo a inflamação no SNC verificada na EAE (FISCHER e REICHMANN, 2001; SCHNARE et al., 2001; SIMARD e RIVERT, 2004). Isto também foi observado no presente estudo, o grupo EAE apresentou maior número de células CD11b⁺ e CD11c⁺, possivelmente

macrófagos e/ou células dendríticas, produzindo IFN- γ , uma citocina ligada ao perfil Th1.

Porém, Marta e colaboradores (2008) revelaram que inesperadamente camundongos TLR4^{-/-} exibiram maior gravidade dos sintomas da EAE com exacerbada resposta Th17. Estes animais apresentaram elevada expressão das citocinas IL-6 e IL-23 por células dendríticas mieloides do baço, aumentando a frequência de linfócitos Th17 e, conseqüentemente, elevação dos níveis séricos de IL-17. Em contraste, a resposta Th1 MOG específica estava comprometida nestes camundongos. O que pode ser explicado pelo estudo de Harrington e colaboradores (2005), ao demonstrar que os linfócitos Th1 e IFN- γ podem inibir a diferenciação dos linfócitos Th17 *in vitro*.

Como já mencionado anteriormente, o *M. tuberculosis* presente no CFA, é rico em CpG DNA não metilado bacteriano, o qual é ligante do TLR9, ajudando na indução da doença (SEGAL, CHANG e SHEVACH, 2000; DENG et al., 2003; WOLF, AMOUZEGAR e SWANBORG, 2007; MIRANDA-HERNANDEZ et al., 2011). De fato, Prinz e colaboradores (2006), sugeriram que o TLR9 é importante para a formação e manutenção das lesões inflamatórias encontradas na EAE. Dados também observados no presente estudo, com obtenção de maior número de células mononucleares expressando o TLR9 na medula espinhal dos camundongos induzidos com MOG₃₅₋₅₅. Ainda de acordo com estes resultados, Prinz e colaboradores (2006) também demonstraram que camundongos TLR9^{-/-} apresentaram melhora, com aparecimento dos sinais clínicos mais tardiamente. Porém, Wolf, Amouzegar e Swanborg (2007) e Miranda-Hernandez e colaboradores (2011) relataram que estes animais apresentaram sintomas mais graves.

Em contraste, Marta e colaboradores (2008) citaram que camundongos TLR9^{-/-} apresentaram piora nos sintomas da doença. Seus estudos demonstraram que a expressão de citocinas pró-inflamatórias por células dendríticas mieloides do baço e linfócitos T foi similar nos animais TLR9^{-/-} e selvagens, porém os camundongos TLR9^{-/-} apresentaram maior expressão esplênica de IL-6, sugerindo que outras células estariam expressando esta citocina nestes camundongos. Kim, Sreih e Bucala (2009) descreveram possíveis mecanismos para a contradição na sinalização deste receptor: a) um efeito anti-inflamatório para a sinalização TLR9, apesar de seu efeito patogênico; b) indução da tolerância cruzada mediante

estimulação repetida de uma família de TLRs; c) o papel do TLR9 na indução da tolerância imunológica.

É importante ressaltar que Prinz e colaboradores (2006) relataram que o TLR2, ligante do *M. tuberculosis*, presente no adjuvante, é dispensável para a indução e progressão da EAE, ao demonstrar que camundongos selvagens e deficientes em TLR2 (TLR2^{-/-}) desenvolveram a doença com 100% de incidência e pontuação média de escore clínico similar. Isto ocorreu porque os componentes micobacterianos também podem se ligar ao TLR1, TLR4 e TLR9. Estes dados justificam a não utilização do TLR2 neste presente estudo.

Além de analisar a ativação dos TLRs, as citocinas secretadas pelas células nos órgãos linfoides periféricos e central também foram avaliadas, visto que a EAE é caracterizada por infiltrados inflamatórios e a localização destes determinam os sinais e sintomas clínicos da doença (NOSEWORTHY et al., 2000). No presente trabalho ao avaliar as citocinas nos linfonodos inguinais e medula espinhal dos animais induzidos com MOG₃₅₋₅₅ nos dias iniciais, foi possível esclarecer o ambiente requerido para o desenvolvimento da EAE, pois a diferenciação de linfócitos T CD4⁺ em células efetoras maduras é dependente das citocinas produzidas pelas APCs como revisto por Zhu e colaboradores (2011) e Chastain e colaboradores (2011). Uma vez ativados na periferia os linfócitos T MOG específicos seguem para o SNC, onde serão estimulados novamente por APCs residentes ou infiltradas (TOMPKINS et al., 2002).

Primeiramente, ao comparar o grupo MOG- com o grupo EAE observou-se que a presença do peptídeo MOG promoveu aumento na concentração das citocinas inflamatórias IL-6, IL-12, IL1- β e TNF- α na medula espinhal dos animais do grupo EAE, sendo que estas diferenças foram significativas no 4º e 7º dia pós-indução para a citocina IL-6 e significativas no 7º dia pós-indução para IL-12, IL1- β , e TNF- α . Este aumento ocorreu na fase inicial, antes do início do aparecimento dos sinais clínicos da doença, que neste estudo ocorreu no 10º dpi. Estes dados estão de acordo com Murphy e colaboradores (2010) que encontraram aumento de IL-6, IL1- β , e TNF- α antes do início dos sintomas clínicos da EAE que também ocorreu no 10º dia pós-indução da doença.

Desta forma, é possível sugerir que o aumento de citocinas pró-inflamatórias no SNC do grupo EAE, durante os dias iniciais da resposta imune, esteja

relacionado à atividade de APCs, incluindo macrófagos e células dendríticas, sobretudo na reapresentação dos antígenos da mielina para estes linfócitos T CD4⁺ MOG específicos, que infiltraram o SNC em função do aumento das quimiocinas CCL20 e CCL5. Estudos demonstram que no SNC os macrófagos residentes, denominados micróglia, são responsáveis pela produção de citocinas inflamatórias fundamentais para o estabelecimento da resposta imune na EAE (OLSON e MILLER, 2004; EBERT et al., 2005, MURPHY et al, 2010). Macrófagos perivasculares também são considerados células importantes no estabelecimento do processo inflamatório no SNC. Kida e colaboradores (1993) relataram que durante a EAE, a expressão de moléculas co-estimulatórias (CD80 e CD86) e MHC-II está aumentada nesses macrófagos, confirmando sua importância como APC e na promoção da inflamação. Fabrick e colaboradores (2005) demonstraram que a depleção de macrófagos perivasculares suprime os sinais clínicos da EAE.

As características neuroimunológicas da EAE têm sido avaliadas juntamente com o perfil de citocinas expressas na medula espinhal: pró-inflamatório (IL-1 β e TNF- α) e anti-inflamatório (TGF- β) (GIATTI et al., 2012). A expressão destas citocinas é maior no início da EAE. Kassiotis e colaboradores (1999) sugerem que o TNF- α acelera o aparecimento da doença. As citocinas IL-1 β e TNF- α liberadas por linfócitos T ativados e macrófagos, facilitam o início da reação imune local. Esta reação pode contribuir para o processo patológico na fase inicial, produzindo danos no endotélio vascular e quebra da BBB (MINAGAR e ALEXANDER, 2003). Desta forma, em conformidade com os dados discutidos anteriormente, os resultados obtidos, no presente estudo, a partir da avaliação da maior concentração das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-12, IL1- β e TNF- α , na medula espinhal dos animais do grupo EAE, sugerem a instalação de um processo inflamatório.

O infiltrado celular no SNC é uma característica patológica importante, tanto na EM, quanto na EAE (ADAMS, POSTON e BUK, 1989). O recrutamento de leucócitos para a microcirculação cerebral, em diferentes condições inflamatórias, depende da expressão de moléculas de adesão em leucócitos (selectinas e integrinas) e seus ligantes nas células endoteliais (VCAM-1 e ICAM-1) (TANG et al, 1996; KERFOOT E KUBES, 2002; JAMES, BULLARD e HICKEY, 2003). Embora os mecanismos de regulação da entrada de leucócitos no SNC ainda não tenham sido totalmente compreendidos, atribui-se às quimiocinas papel importante na regulação

da expressão de moléculas de adesão em linfócitos, assim como a migração destas células para o SNC (RANSOHOFF, 2002; BABCOCK e OWENS, 2003).

A avaliação das quimiocinas CCL20 e CCL5, relacionadas, respectivamente, ao perfil Th17 e Th1, pode ajudar no esclarecimento dos subtipos de linfócitos recrutados para o SNC. Com os resultados obtidos neste estudo, é possível observar que existe aumento da concentração de CCL5 e CCL20 na medula espinhal dos animais do grupo EAE a partir do 4º dia pós-indução em relação ao grupo MOG-. No grupo MOG-, cujas concentrações de CCL5 e CCL20 mantiveram-se elevadas apenas nos linfonodos inguinais e reduzidas na medula espinhal, indicam a manutenção de células inflamatórias na periferia. Estudos desenvolvidos por Reboldi e colaboradores (2009), demonstraram que camundongos deficientes em CCR6, receptor para CCL20, são resistentes à indução da EAE, provavelmente pela incapacidade de penetração de células inflamatórias no SNC.

Alves e colaboradores (2012) tratando os animais com EAE com derivados antraquinônicos, mostraram redução das quimiocinas CCL5 e CCL20 no SNC. Além disto, pacientes com EM apresentam expressão elevada de CCL5, entre outras quimiocinas responsáveis pelo recrutamento de leucócitos para o SNC (HOLMAN, KLEIN e RANSOHOFF, 2011).

Os dados encontrados para o perfil de quimiocinas CCL5 e CCL20 na medula espinhal, no presente trabalho, coincidiu com o infiltrado celular evidenciado pelos cortes histológicos. A concentração elevada de quimiocinas no 7º dpi foi acompanhada por infiltrado celular inflamatório intenso na região meningeal, estendendo-se pelo parênquima do tecido dos animais do grupo EAE, compatível também com o início do escore clínico (10º dpi) e elevada produção de citocinas pró-inflamatórias no SNC a partir do 4º dpi.

Uma vez instalado o processo inflamatório, a identificação do perfil de células presente no SNC é fundamental para a compreensão da patogênese da doença. Nicoletti e colaboradores, (1996) e Lock e colaboradores, (2002) sugeriram que a EAE é uma doença autoimune mediada por linfócitos Th1, ao detectar aumento na concentração de IL-12 nos animais que apresentaram escore clínico. Esta citocina regula a diferenciação deste subtipo Th1, ao ativar o fator de transcrição STAT4 (transdutor de sinal e ativador de transcrição 4) nos linfócitos T CD4⁺, induzindo a produção de IFN- γ . Estes dados também foram observados no

presente estudo, com aumento dos níveis de IL-12 no 7º dpi na medula espinhal dos animais do grupo EAE.

Sendo assim, é possível supor que o início e progressão da EAE estejam relacionados com os subtipos celulares Th1 e Th17 (RENNO et al., 1995; JUEDES et al., 2000; FLORIS et al., 2004; HEDEGAARD et al., 2008; HUPPERT et al., 2010), uma vez que os linfócitos Th1 ao promover a inflamação no SNC facilitam a infiltração dos linfócitos Th17 nas lesões da EAE (O'CONNOR et al., 2008; MURPHY et al., 2010). Estas células Th17 MOG específicas por sua vez, ao migrar através da BBB geram uma inflamação caracterizada por recrutamento de neutrófilos para o SNC (KROENKE et al., 2008) com morte de neurônios o que leva ao agravamento da doença (KEBIR et al., 2007). Desta forma o IFN- γ e IL-17, que são as citocinas produzidas por linfócitos Th1 e Th17, respectivamente, estão correlacionados com a gravidade da EAE (HEDEGAARD et al., 2008; HUPPERT et al., 2010).

No presente trabalho, ao comparar o grupo MOG- com o grupo EAE observa-se que a presença do peptídeo MOG também promoveu aumento da concentração destas citocinas inflamatórias IFN- γ e IL-17 na medula espinhal, sendo que estas diferenças foram significativas no 4º e 7º dia pós-indução para a citocina IFN- γ e significativa no 7º dia pós-indução para IL-17.

De uma forma geral, os dados observados no presente estudo, demonstram que na medula espinhal as citocinas inflamatórias e quimiocinas estão reduzidas no grupo MOG- e aumentadas no grupo EAE, nos pontos avaliados, sugerindo mais uma vez a importância do peptídeo MOG em estabelecer o processo inflamatório no SNC.

Recentemente foi demonstrado que a expressão das citocinas IL-1 β e TNF- α na medula espinhal correlacionam-se com a infiltração de macrófagos e linfócitos T, bem como a ativação de micróglia, característica da fase inicial da EAE (GIATTI et al., 2012). Sabe-se que o aumento da expressão de IL-1 β e TNF- α é acompanhado do aumento da expressão de TGF- β . Esta citocina tem um papel importante na supressão da resposta em doenças autoimunes e tem sido proposto desempenhar um perfil inibitório na EM (RACKE et al., 1991; JOHNS e SRIRAM 1993; LAOUAR et al., 2008). Em conformidade com esses dados, as análises do presente estudo, indicam que, além do direcionamento para o perfil Th1 e Th17, também foi possível observar aumento na produção de TGF- β , a partir do 7º dpi na medula espinhal dos

animais do grupo EAE em relação aos animais do grupo MOG-, sugerindo a indução de uma resposta imune reguladora.

A diferenciação dos linfócitos Th17, produtores da citocina pró-inflamatória IL-17, é induzida na presença de IL-6 e TGF- β (BETTELLI et al., 2006; QIN et al., 2009). Pasare e Medzhitov (2003) demonstraram que a citocina IL-6 secretada por células estimuladas com LPS suprimem estas respostas reguladoras. Porém, Korn e colaboradores (2008) relataram que na ausência de IL-6 e na presença de TGF- β , a diferenciação dos linfócitos Th17 é prejudicada, favorecendo a indução dos linfócitos Treg, importantes nos mecanismos imunossupressores. Neste contexto, Matsumoto, Ohmori e Fujiwara (1992) demonstraram que na fase de indução da doença, a micróglia prolifera em resposta a infiltração dos linfócitos T e apesar do número destas células estarem aumentadas nas lesões, estas se encontram diminuídas na EAE, sugerindo que outros tipos celulares em adição aos linfócitos Treg, estejam contribuindo para esta modulação (NAPOLI e NEUMANN, 2010). Almoda e colaboradores (2009) e Mikita e colaboradores (2011) demonstraram que a micróglia e macrófagos ativados podem estar envolvidos na remissão da EAE, ao observar melhora dos sinais clínicos da doença com a administração de subpopulações de macrófagos M2, os quais apresentam características imunomoduladoras.

No presente trabalho também ficou evidenciado a tentativa do sistema imune em regular a resposta inflamatória estabelecida pela indução do modelo. No grupo MOG-, onde o processo inflamatório permaneceu restrito a periferia, é possível observar o aumento de citocinas regulatórias no sobrenadante dos linfonodos inguinais, entretanto, no grupo EAE, o qual foi estabelecido um processo inflamatório no SNC, as citocinas regulatórias IL-10 e TGF- β estão elevadas na medula espinhal, em relação ao grupo MOG-. Vale ressaltar que, em outros estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa do Laboratório de Imunologia-ICB/UFJF, os resultados obtidos a partir do 10º dia de indução da EAE, há uma gradativa diminuição dos níveis das citocinas regulatórias IL-10 e TGF- β , demonstrando a importância da modulação destas citocinas na fase inicial da doença.

Outros trabalhos mostram que as células reguladoras e os fatores por elas secretados, principalmente IL-10, são importantes não somente na supressão dos linfócitos T efetores, mas também na resposta imune inata ao sub-regular a atividade de APCs, bloqueando a ação de ativação destes linfócitos (JONOULEIT et

al., 2000; MAHNKE, BEDKE e ENK, 2007). Assim, o perfil dos mediadores pró e anti-inflamatórios podem decidir ou não a progressão da doença (KRUGLOV et al., 2011). Desta forma, a partir dos resultados obtidos com relação a IL-10 e TGF- β , pode-se sugerir, que estas citocinas regulatórias aumentadas nos primeiros dias pós-indução da EAE, no SNC, poderiam ser importantes como futuros alvos de terapia para a encefalomielite, ou seja, se estas citocinas mantivessem este aumento durante o desenvolvimento da doença, poderiam regular a produção das citocinas inflamatórias IFN- γ e IL-17.

Assim, os dados obtidos neste estudo irão contribuir com o grupo de pesquisa do Laboratório de Imunologia-ICB/UFJF, que está a seis anos trabalhando com este modelo, induzindo a EAE com o peptídeo MOG₃₅₋₅₅ em camundongos C57BL/6 e avaliando os efeitos de drogas de origem natural ou sintética, visando contribuir com o desenvolvimento de novas terapias que possam proporcionar resultados mais promissores.

7 CONCLUSÃO

O papel da resposta imune inata, evidenciado neste estudo, pelo aumento da expressão de TLRs e da produção de citocinas pró-inflamatórias por populações de macrófagos, ativados pelos adjuvantes e capazes de apresentar o peptídeo da mielina, mostram-se como fatores críticos para a indução da encefalomielite autoimune experimental. Além disso, o aumento de padrões anti-inflamatórios, ainda nos pontos iniciais do desenvolvimento da doença, sugere o uso destes padrões, como mecanismos de regulação do modelo experimental e, possivelmente da esclerose múltipla, o que pode ser utilizado como alvo terapêutico.

REFERÊNCIAS

ACKERMAN, A.L.; CRESSWELL, P. 2004. Cellular mechanisms governing cross presentation of exogenous antigens. **Nature Immunology**, **5 (7)**: 678-684.

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

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

ALMOLDA, B.; COSTA, M.; MONTOYA, M.; GONZÁLEZ, B.; CASTELLANO, B. 2009. CD4 microglial expression correlates with spontaneous clinical improvement in the acute Lewis rat EAE model. **Journal of Neuroimmunology**, **209 (1-2)**: 65-80.

ALVES, C. C. S.; CASTRO, S. B. R.; COSTA, C. F.; DIAS, A. T.; ALVES, C. J.; RODRIGUES, M. F.; TEIXEIRA, H. C.; ALMEIDA, M. V.; FERREIRA, A. P. 2012 Anthraquinone derivative O,O'-bis-(3'-iodopropyl)-1,4 hidroxyanthraquinone modulates immune response and improves experimental autoimmune encephalomyelitis. **International Immunopharmacology**, **14 (2)**: 127–132.

ANDERSON, D. W; ELLENBERG, J. H.; LEVENTHAL, C. M.; REINGOLD, S. C.; RODRIGUEZ, M.; SILBERBERG, D. H. 1992. Revised estimate of the prevalence of multiple sclerosis in the United States. **Annual Neurology** **31 (3)**: 333-336.

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

ARNASON, B. G. 1983. Relevance of experimental allergic encephalomyelitis to multiple sclerosis. **Neurology Clinical**, **1 (3)**:765–782.

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

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. 2008. Reversal of axonal loss and disability in a mouse model of progressive multiple sclerosis. **The Journal of Clinical Investigation**, **118 (4)**: 1532-1543.

BELMADANI, A.; TRAN, P.B.; REN, D.; MILLER, R.J. 2006. Chemokines Regulate the Migration of Neural Progenitors to Sites of Neuroinflammation. **The Journal of Neuroscience**, **26 (12)**: 3182-3191.

BETELLI, E.; DAS, M.P.; HOWARD, E.D.; WEINER, H.L.; SOBEL, R.A.; KUCHROO, V. K. 1998. IL-10 is critical in the regulation of autoimmune encephalomyelitis as demonstrated by studies of IL-10 and IL-4 deficient and transgenic mice. **The Journal of Immunology**, **161 (7)**: 3299-3306.

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

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

BLACON, Y. C.; FARIAS, A. S.; GOELNITZ, U.; LOPES, S. C. P.; ARRAIS-SILVA, W. W.; CARVALHO, B. O.; AMINO, R.; WUNDERLICH, G.; SANTOS, L. M.; GIORGIO, S.; COSTA, F. T. 2008. Hyperbaric oxygen prevents early death caused by experimental cerebral malária. **Plos One**, **3 (9)**: e3126.

BRENNAN, C. A.; ANDERSON, K. V. 2004. Drosophila: the genetics of innate immune recognition and response. **Annual Review of Immunology**, **22**: 457- 483.

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

BSIBSI, M.; PhD RAVID, R.; PhD GVERIC, D.; PhD VAN NOORT, J. M. 2002. Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, **61 (11)**: 1013-1021.

BULJEVAC, D.; FLACH, H. Z.; HOP, W. C. J.; HIJDRA, D.; LAMAN, J. D.; SAVELKOUL, H. F. J.; VAN DER MECHÉ, F. G. A.; VAN DOORN, P. A.; HINTZEN, R. Q. 2002. Prospective study on the relationship between infections and multiple sclerosis exacerbations. **Brain**, **125 (5)**: 952-960.

CALLEGARO, D.; GOLDBAUM, M.; MORAIS, L. 2001. The prevalence of multiple sclerosis in the city of São Paulo, Brazil. **Acta Neurologica Scandinavica**, **104 (4)**: 208-213.

CARPENTIER, P.A.; DUNCAN, D'ANNE S.; MILLER, S.D. 2007. Glial Toll-like receptor signaling in central nervous system infection and autoimmunity. **Brain, Behavior and Immunity**, **22 (2)**: 140-147.

CARSON, M. J. ; REILLY, C. R.; SUTCLIFFE, J.G.; LO, D. 1998. Mature microglia resemble immature antigen-presenting cells. **Glia** **22 (1)**: 72-85.

CARTY, M.; BOWIE, A.G. 2011. Evaluating the role of Toll-like receptors in diseases of the central nervous system. **Biochemical Pharmacology**, **81 (7)**: 825-837.

CHASTAIN, E. M. L.; DUNCAN, D'ANNE S.; RODGERS, J. M. MILLER, S. D. 2011. The role of antigen presenting cells in multiple sclerosis. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1812 (2)**: 265-274.

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

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

DENG, C.; RADU, C.; DIAB, A.; TSEN, M. F.; HUSSAIN, R.; COWDERY, J. S.; RACKE, M.K.; THOMAS, J. A. 2003. IL-1 receptor associated kinase 1 regulates susceptibility to organ-specific autoimmunity. **Journal of Immunology**, **170 (6)**: 2833-2842.

DINIZ, D. S.; MELO, M. R.; MORAES, L.; ARANTES, E. A. A. 2008. Estudo epidemiológico da prevalência de portadores de esclerose múltipla na cidade de Goiânia – protocolo e resultados iniciais. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, **66**: 163.

DUNCAN, D. S.; MILLER, S. D. 2011. CNS expression of B7-H1 regulates pro-inflammatory cytokine production and alters severity of Theiler's virus-induced demyelinating disease. **PlosOne**, **6 (4)**: 1-11.

EBERT, S.; GERBER, J.; BADER, S.; MUHLHAUSER, F.; BRECHTEL, K.; MITCHELL, T. J.; NAU, R. 2005. Dose-dependent activation of microglial cells by Toll-like receptor agonists alone and in combination. **Journal Neuroimmunology**, **159 (1-2)**: 87–96.

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

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

FABRIEK, B. O.; VAN HAASSTERT, E. S.; GALEA, I.; POLFLIET, M. M.; DÖPP, E. D.; VAN DEN HEUVEL, M. M.; VAN DEN BERG, T. K.; DE GROOT, C. J.; VAN DER VALK, P.; DIJKSTRA, C. D. 2005. CD163-positive perivascular macrophages in the human CNS express molecules for antigen recognition and presentation. **Glia**, **51 (4)**: 297-305.

FERREIRA, M. L. B.; MACHADO, M. I. M.; VILELA, M. L.; GUEDES, M. J.; ATAÍDE, J. R. L.; SANTOS, S. 2004. Epidemiologia de 118 casos de esclerose múltipla com seguimento de 15 anos no centro de referência do Hospital da Restauração de Pernambuco. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, **62(4)**: 1027- 1032.

FISCHER, H. G.; REICHMANN, G. 2001. Brain dendritic cells and macrophages / microglia in central nervous system inflammation. **Journal Immunology**, **166 (4)**: 2717–2726.

FITZGERALD, K. A.; ROWE, D.C.; BARNES, B. J.; CAFFREY, D. R.; VISINTIN, A.; LATZ, E.; MONKS, B.; PITHA, P. M.; GOLENBOCK, D.T. 2003. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF- κ B involves the Toll adapters TRAM and TRIF. **The Journal of Experimental Medicine**, **198 (7)**: 1043-1055.

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

FRAGOSO, Y. D.; PERES, M. 2007. Prevalence of multiple sclerosis in the city of Santos, SP, Brazil. **Brasil Epidemiologia**, **10**: 479-82.

FRANKLIN R.J.; FFRENCH-CONSTANT, C. 2008. Remyelination in the CNS: from biology to therapy, **Nature Review. Neuroscience**, **9 (11)**: 839–855.

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

GIATTI, S.; BORASO, M.; ABBIATI, F.; BALLARINI, E.; CALABRESE, D.; SANTOS-GALINDO, M.; RIGOLIO, R.; PESARESI, M.; CARUSO, D.; VIVIANI, B.; CAVALETTI, G.; GARCIA-SEGURA, L. M.; MELCANGI, R. C. 2012. Multimodal Analysis in Acute and Chronic Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, **1890-1904**.

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

GOLD, R.; LININGTON, C.; LASSMANN, H. 2006. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. **Brain**, **129 (Pt8)**: 1953-1971.

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

GRZESIUK, A. K. 2006. Características clínicas e epidemiológicas de 20 pacientes portadores de esclerose múltipla acompanhados em Cuiabá - Mato Grosso. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, **64**: 635-638.

GUO, B.; CHANG, E.Y.; CHENG, G. 2008. The type I IFN induction pathway constrains Th17-mediated autoimmune inflammation in mice. **Journal Clinical Investigation**, **118 (5)**: 1680-169.

HACKER, H.; REDECKE, V.; BLAGOEV, B.; KRATCHMAROVA, I.; HSU, L. C.; WANG, G. G.; KAMPS, M. P.; RAZ, E.; WAGNER, H.; HACKER, G.; MANN, M.; KARIN, M. 2006. Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. **Nature**, **439 (7073)**: 204-207.

HANSEN, B. S.; HUSSAIN, R. Z.; LOVETT-RACKE, A. E.; THOMAS, J. A.; RACKE, M. K. 2006. Multiple toll-like receptor agonists act as potent adjuvants in the induction of autoimmunity. **Journal Neuroimmunology**, **172 (1-2)**: 94-103.

HARRINGTON, L. E.; HATTON, R. D.; MANGAN, P. R.; TURNER, H.; MURPHY, T. L.; MURPHY, K. M.; WEAVER, C. T. 2005. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. **Nature Immunology**, **6 (11)**: 1123-1132.

HASHIMOTO, C.; HUDSON, K. L.; ANDERSON, K. V. 1988. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. **Cell**, **52 (2)**: 269-79.

HAUSER, S. L.; OKSENBERG, J. R. 2006. The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration, **Neuron** **52 (1)**: 61-76.

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

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

HUITINGA, I.; DAMOISEAUX, J. G.; DÖPP, E. A.; DIJKSTRA, C. D. 1993. Treatment with anti-CR3 antibodies ED7 and ED8 suppresses experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats. **European Journal of Immunology**, **23 (3)**: 709-715.

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. 2010. Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. **The FASEB Journal**, **24 (4)**: 1023-1034.

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

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

JOHNS, L. D.; SRIRAM, S. 1993. Experimental allergic encephalomyelitis: neutralizing antibody to TGF beta 1 enhances the clinical severity of the disease. **Journal of Neuroimmunology**, **47 (1)**: 1-7.

JONULEIT, H.; SCHMITT, E.; SCHULER, G.; KNOP, J.; ENK, A. H. 2000. Induction of interleukin 10-producing, non-proliferating CD4⁺ T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. **Journal Experimental Medicine**, **192 (9)**: 1213-1222.

JUEDES, A.E.; HJELMSTRÖM, P.; BERGMAN, C.M.; NEILD, A.L.; RUDDLE, N.H. 2000. 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**, **164 (1)**: 419-426.

JUNG, S.; HUITINGA, I.; SCHMIDT, B.; ZIELASEK, J.; DIJKSTRA, C. D.; TOYKA, K. V.; HARTUNG, H. P. 1993. Selective elimination of macrophages by dichlormethylene diphosphonate containing liposomes suppresses experimental autoimmune neuritis. **Journal of the Neurological Sciences**, **119 (2)**: 195-202.

KABELITZ, D. 2007. Expression and function of Toll-like receptors in T lymphocytes. **Current Opinion in Immunology**, **19 (1)**: 39-45.

KAIMEN-MACIEL, D. R.; MEDEIROS, M.; PISTORI, R.; BIAGGIO, C.; ROCHA, F.; LOPES, L. H. G. 2004. The prevalence of multiple sclerosis in two cities in the North of Parana state – Brazil. **Forum International**, **10**: S158.

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. 2010. Astrocyte-Restricted Ablation of Interleukin-17-Induced Act1-Mediated Signaling Ameliorates Autoimmune Encephalomyelitis. **Immunity**, **32 (3)**: 414-425.

KASSIOTIS, G.; PASPARAKIS, M.; KOLLIAS, G.; PROBERT, L. 1999. TNF accelerates the onset but does not alter the incidence and severity of myelin basic protein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. **European Journal of Immunology**, **29 (3)**: 774-780.

KAWAI T; AKIRA S. 2006. TLR signaling. **Cell Death Differ** **13 (5)**: 816-825.

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

KENNY, E. F.; O'NEILL, L. A. 2008. Signaling adaptors used by Toll-like receptors: an update. **Cytokine** **43 (3)**: 342-349.

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

KERFOOT, S. M.; LONG, E. M.; HICKEY, M. J.; ANDONEGUI, G.; LAPOINTE, B.M.; ZANARDO, R. C. O.; BONDER, C.; JAMES, W. G.; ROBBINS, S. M.; KUBES, P. 2004. TRL4 contributes to disease-inducing mechanisms resulting in central nervous system autoimmune disease. **Journal of immunology**, **173 (11)**: 7070-7077.

KIDA, S.; STEART, P.V. ZHANG, E.T.; WELLER, R.O. 1993. Perivascular cells act as scavengers in the cerebral perivascular spaces and remain distinct from pericytes, microglia and macrophages. **Acta Neuropathology**, **85 (6)**: 646-652.

KIM, W. U.; SREIH, A.; BUCALA, R. 2009. Toll-like receptors in systemic lupus erythematosus prospects for therapeutic intervention. **Autoimmunity Review**, **8 (3)**: 204-208.

KONNO, H.; YAMAMOTO, T.; IWASAKI, Y.; SAITOH, T.; SUZUKI, H.; TERUNUMA, H. 1989. Ia-expressing microglial cells in experimental allergic encephalomyelitis in rats. **Acta Neuropathologica**, **77 (5)**: 472-479.

KORN, T.; MITSDOERFFER, M.; CROXFORD, A. L.; AWATSHI, A.; DARDALHON, V. A.; GALILEOS, G.; VOLLMAR, P.; STRITESKY, G. L.; KAPLAN, M. H.; WAISMAN, A.; KUCHROO, V. K.; OUKKA, M. 2008. IL-6 controls Th17 immunity in vivo by inhibiting the conversion of conventional T cells into Foxp3+ regulatory cells. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**, **105 (47)**: 18460-18465.

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

KRUGLOV, A. A.; LAMPROPOULOU, V.; FILLATREAU, S.; NEDOSPASOV, S. A. 2011. Pathogenic and protective functions of TNF in neuroinflammation are defined by its expression in T lymphocytes and myeloid cells. **Journal of Immunology**, **187 (11)**: 5660-5670.

LAMPROPOULOU, V.; HOEHLIG, K.; ROCH, T.; NEVES, P.; CALDERON GOMEZ, E.; SWEENIE, C. H.; HAO, Y.; FREITAS, A. A.; STEINHOFF, U.; ANDERTON, S. M.; FILLATREAU, S. 2008. TLR-activated B cells suppress T cell-mediated autoimmunity. **Journal of Immunology**, **180 (7)**: 4763-4773.

LANA-PEIXOTO, M. A.; FROTA, E.; CAMPOS, G. B.; BOTELHO, C. M.; ARAGÃO, A. L. 2002. The prevalence of multiple sclerosis in Belo Horizonte, Brazil. **Multiple Sclerosis**, **8**: S38.

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. 2002. A functional and structural basis for TCR cross-reactivity in multiple sclerosis. **Nature Immunology**, **3 (10)**: 940-943.

LAOUAR, Y.; TOWN, T.; JENG, D.; TRAN, E.; WAN, Y.; KUCHROO, V.K.; FLAVELL, R.A. 2008. TGF- β signaling in dendritic cells is a prerequisite for the control of autoimmune encephalomyelitis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **105(31)**: 10865-10870.

LAURENCE, A., O'SHEA, J.J. 2007 T_H17 differentiation: of mice and men. **Nature Immunology**, **8 (9)**: 903-905.

LEMAITRE, B.; NICOLAS, E.; MICHAUT, L.; REICHHART, J. M.; HOFFMANN, J. A. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. **Cell**, **86 (6)**: 973-983.

LOCK, C.; HERMANS, G.; PEDOTTI, R.; BRENDOLAN, A.; SCHADT, E.; GARREN, H.; LANGER-GOULD, A.; STROBER, S.; CANNELLA, B.; ALLARD, J.; KLONOWSKI, P.; AUSTIN, A.; LAD, N.; KAMINSKI, N.; GALLI, S. J.; OKSENBERG, J. R.; RAINE, C. S.; HELLER, R.; STEINMAN, L. 2002. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. **Nature Medicine**, **8 (5)**: 500-508.

LUBLIN, F. D. 1982. Delayed, relapsing experimental allergic encephalomyelitis in mice. Role of adjuvants and pertussis vaccine. **Journal of the Neurological Sciences**, **7 (1)**:105–110.

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

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

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

MAHNKE, K.; BEDKE, T.; ENK, A.H. 2007. Regulatory conversation between antigen presenting cells and regulatory T cells enhance immune suppression. **Cell Immunology**, **250 (1-2)**: 1-13.

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

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

MARTIN, R.; MCFARLAND, H. F.; MCFARLIN, D. E. 1992. Immunological aspects of demyelinating diseases. **Annual Review Immunology**, **10**: 153-187.

MARTINEZ, F. O.; SICA, A.; MANTOVANI, A.; LOCATI, M. 2008. Macrophage activation and polarization. **Frontiers in Bioscience**, **13**: 453-461.

MATSUMOTO, Y.; OHMORI, K.; FUJIWARA, M. 1992. Microglial and astroglial reactions to inflammatory lesions of experimental autoimmune encephalomyelitis in the rat central nervous system. **Journal of Neuroimmunology**, **37 (1-2)**: 23-33.

MAYO, L.; QUINTANA, F. J.; WEINER, H. L. 2012. The innate immune system in demyelinating disease. **Immunological Reviews** **248 (1)**: 170-187.

McQUIBBAN, G.A.; GONG, J.H.; WONG, J.P.; WALLACE, J.L.; CLARK-LEWIS, I.; OVERALL, C.M. 2002. Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant protein-1 generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo. **Blood**, **100 (4)**: 1160-1107.

MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C. A. Jr. 1997. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**, **388 (6640)**: 394-397.

MEDZHITOV, R.; HURLBURT, P.P.; KOPP, E.; STADLEN, A.; CHEN, C.; GHOSH, S.; JANEWAY, JR. C. A. 1998. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. **Molecular Cell**, **2 (2)**: 253-258.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. Jr. 2000. Innate immunity. **The New England Journal Medicine**, **343 (5)**: 338-344.

MIKITA, J.; DUBOURDIEU-CASSAGNO, N.; DELOIRE, M. S.; VEKRIS, A.; BIRAN, M.; RAFFARD, G.; BROCHET, B.; CANRON, M. H.; FRANCONI, J. M.; BOIZIAU, C.; PETRY, K. G. 2011. Altered M1/M2 activation patterns of monocytes in severe relapsing experimental rat model of multiple sclerosis. Amelioration of clinical status by M2 activated monocyte administration. **Multiple Sclerosis**, **17 (1)**: 2-15.

MILLER ,D.H.; LEARY, S.M. 2007 Primary-progressive multiple sclerosis. **Lancet Neurology**, **6 (10)**: 903–912.

MILLS, K. H. G., 2011. TLR-dependent T cell activation in autoimmunity. **Nature Reviews**, **11 (12)**: 807-822.

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

MINAGAR, A.; ALEXANDER, J. S. 2003. Blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis**, **9 (6)**: 540-549.

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

MIRANDA-HERNANDEZ, S.; GERLACH, N.; FLETCHER, J. M.; BIROS, E.; MACK, M.; KÖRNER, H.; BAXTER, A. G. 2011. Role for MyD88, TLR2 and TLR9 but not TLR1, TLR4 or TLR6 in experimental autoimmune encephalomyelitis. **The Journal of Immunology**, **187 (2)**: 791-804.

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

MODLIN, R.L. 2012. Innate immunity: ignored for decades, but not forgotten. **The Journal of Investigative Dermatology**, **132 (3)**: 882-886.

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

NAPOLI, I.; NEUMANN, H. 2010. Protective effects of microglia in multiple sclerosis. **Experimental Neurology**, **225 (1)**: 24-28.

NICOLETTI, F.; PATTI, F.; COCUZZA, C.; ZACCONE, P.; NICOLETTI, A.; DI MARCO, R.; REGGIO, A. 1996. Elevated serum levels of interleukin-12 in chronic progressive multiple sclerosis. **Journal of Neuroimmunology**, **70 (1)**: 87-90.

NIELSEN, C. H.; GALDIERS, M. P.; HEDEGAARD, C. J.; GRAHAM, R.; LESLIE, Q. 2010. The self-antigen, thyroglobulin, induces antigen-experienced CD4⁺ T cells from healthy donors to proliferate and promote production of the regulatory cytokine, interleukin-10, by monocytes. **Immunology**, **129 (2)**: 291-299.

NOSEWORTHY, J. H.; LUCCHINETTI, C.; RODRIGUEZ, M.; WEINSHENKER, B. G. 2000. Multiple sclerosis. **The New England Journal of Medicine**, **334(13)**: 938-952.

O'CONNOR, R.I A.; PRENDERGAST, C. T.; SABATOS, C. A.; LAU, C. W. Z.; LEECH, M. D.; WRAITH, D. C.; ANDERTON, S.M. 2008 Cutting Edge: Th1 Cells Facilitate the Entry of Th17 Cells to the Central Nervous System during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **Journal of Immunology**, **181 (6)**: 3750-3754.

OKSENBERG, J.R.; J.R.; BARANZINI, S. E., SAWCER, S.; HAUSER, S. L. 2008. The genetics of multiple sclerosis: SNPs to pathways to pathogenesis. **Nature Reviews Genetics**, **9 (7)**: 516-523.

OLSON, J. K.; MILLER, S.D. 2004. Microglia initiate central nervous system innate and adaptative immune responses through multiple TLRs. **Journal. Immunology**, **173 (6)**: 3916–3924.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). 2008. Atlas: Multiples Sclerosis resources in the World. **World Health Organization**, 1-54.

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

PASARE, C.; MEDZHITOV, R.; 2003. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. **Science** **299 (5609)**: 1033-1036.

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

PETSKA, S.; KRAUSE, C. D.; SARKAZ, D.; WALTER, M. R.; SHI, Y; FISEHR, P. B. 2004. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. **Annual Review of Immunology**, **22**: 929-979.

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

PRINZ M, GARBE F, SCHMIDT H, MILDNER A, GUTCHER I, WOLTER K.; PIESCHE, M.; SCHOROERS, R.; WEISS, E.; KIRSCHNING, C.J.; ROCHFORD, C.D.P.; BRÜC, W.; BECKER, B. 2006. Innate immunity mediated by TLR9 modulates pathogenicity in an animal model of multiple sclerosis. **The Journal of Clinical Investigation**, **116 (2)**: 456-464.

QIN, H.; WANG, L.; FENG, T.; ELSON, C.O.; NIYONGERE, S. A.; LEE, S. J.; REYNOLDS, S. L.; WEAVER, C. T.; ROARTY, K.; SERRA, R.; BENVENISTE, E. N.; CONG, Y. 2009. TGF-beta promotes Th17 cell development through inhibition of SOCS3. **Journal of Immunology**, **183 (1)**: 97-105.

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

RACKE, M. K.; DHIB-JALBUT, S.; CANNELLA, B.; ALBERT, P. S.; RAINE, C. S.; MCFARLIN, D. E. 1991. Prevention and treatment of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis by transforming growth factor-beta 1. **Journal of Immunology**, **146 (9)**: 3012–3017.

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

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

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

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**, **10 (5)**: 514-523.

RENNO, T.; KRAKOWSKI, M.; PICCIRILLO, C.; LIN, J.Y.; OWENS, T. 1995. TNF- α 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**, **154 (2)**: 944-953.

RIBEIRO, S. B. F.; MAIA, D. F.; RIBEIRO, J. B.; CARDOSO, F. A. G.; SILVA, C. 2011. Clinical and epidemiological profile of patients with multiple sclerosis in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, **69 (2-A)**: 184-187.

ROCHA, F. C.; HERRERA, L. C.; MORALES, R. R. 2002. Multiple sclerosis in Botucatu, Brazil: a population study. **Multiple Sclerosis**, **8**: S41.

SADOVNICK, A. D.; EBERS, G. C. 1993. Epidemiology of multiple sclerosis: a critical overview. **The Canadian Journal of Neurological Sciences**. **20 (1)**: 17-29.

SCHNARE, M.; BARTON, G.M.; HOLT, A.C.; TAKEDA, K.; AKIRA, S.; MEDZHITOV, R. 2001. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. **Nature Immunology** **2 (10)**: 947-950.

SEGAL, B.M.; CHANG, J.T.; SHEVACH, E. M. 2000. CpG oligonucleotides are potent adjuvants for the activation of autoreactive encephalitogenic T cells in vivo. **Journal Immunology**, **164 (11)**: 5683-5688.

SEKI, S.; OSADA, S.; ONO, S. AOSASA, S.; HABU, Y.; NISHIKAGE, T.; MOCHIZUKI, H.; HIRAIDE, H. 1998. Role of liver NK cells and peritoneal macrophages in gamma interferon and interleukin-10 production in experimental bacterial peritonitis in mice. **Infection and Immunity**, **66 (11)**: 5286-5294.

SHIN, T.; KOJIMA, T.; TANUMA, N.; ISHIHARA, Y.; MATSUMOTO, Y. 1995. The subarachnoid space as a site for precursor T cell proliferation and effector T cell selection in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Neuroimmunology**, **56 (2)**: 171-178.

SHIN, T.; AHN, M.; MATSUMOTO, Y. 2012. Mechanism of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats: recent insights from macrophages. **Anatomy & Cell Biology**, **45 (3)**: 141-148.

SHRIKANT, P.; BENVENISTE, E. N. 1996. The central nervous system as an immunocompetent organ: role of glial cells in antigen presentation. **The Journal of Immunology**, **157(5)**: 1819-22.

SIMARD, A. R.; RIVERT, S. 2004. Bone marrow stem cells have the ability to populate the entire central nervous system into fully differentiated parenchymal microglia. **The FASEB Journal**, **10 (1096)**: 1504-1517.

SRINIVASAN, M.; GIENAPP, I. E.; STUCKMAN, S. S.; ROGERS, C. J.; JEWELL, S. D.; KAUMAYA, P. T.; WHITACRE, C. C. 2002. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis using peptide mimics of CD28. **The Journal of Immunology**, **169 (4)**: 2180–2188.

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

SOULIKA, A. M.; LEE, E.; MCCAULEY, E.; MIERS, L.; BANNERMAN, P.; PLEASURE, D. 2009. Initiation and Progression of Axonopathy in Experimental. **The Journal of Neuroscience**, **29 (47)**:14965-14979.

STUVE, O, YOUSSEF, S.; SLAVIN, A. J.; KING, C. L.; PATARROYO, J. C.; HIRSCHBERG, D. L.; BRICKEY, W. J.; SOOS, J. M.; PISKURICH, J. F.; CHAPMAN, H. A.; ZAMVIL, S. S. 2002. The role of the MHC class II transactivator in class II expression and antigen presentation by astrocytes and in susceptibility to central nervous system autoimmune disease. **The Journal of Immunology**, **169 (12)**: 6720-6732.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. 2004. TLR signaling pathways. **Seminars in Immunology**, **16 (1)**: 3-9.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. 2005. Toll-like receptors in innate immunity. **International Immunology**, **17 (1)**: 1-14.

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

TEIXEIRA, S. A.; VARRIANO, A. A.; BOLONHEIS, S. M.; MUSCARA, M. N. 2005. Experimental autoimmune encephalomyelitis: A heterogeneous group of animal models to study human multiple sclerosis. **Drug Discovery Today: Disease Models**, **2 (2)**: 127- 134.

TOMPKINS, S. M.; PADILLA, J.; DAL CANTO, M. C.; TING, J. P.; VAN KAER, L.; MILLER, S. D. 2002. Central nervous system processing of myelin antigen is required for the initiation of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal Immunology**, **168 (8)**: 4173-4183.

TRAPP, B. D.; NAVE, K. A. 2008. Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder ? **Annual Review Neuroscience**, **31**: 247-269.

TURLEY, D. M.; MILLER, S.D. 2010 Prospects for antigen-specific tolerance based therapies for the treatment of multiple sclerosis. **Results and Problems in Cell Differentiation**, **51**: 217-235.

UEMATSU, S.; AKIRA, S. 2006. Toll-like receptors and innate immunity. **Journal Molecular Medicine**. **84 (9)**: 712-725.

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

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**, **13 (8)**: 935-943.

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

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

WENSKY, A.K.; FURTADO, G.C.; MARCONDES, M.C.G.; CHEN, S.; MANFRA, D.; LIRA, S. A.; ZAGZAG, D.; LAFAILLE, J.J. 2005. IFN- γ Determines Distinct Clinical Outcomes in Autoimmune Encephalomyelitis. **The Journal of Immunology**, **174 (3)**: 1416-1423.

WEST, A. P.; KOBLANSKY, A. A.; GHOSH, S. 2006. Recognition and signaling by toll-like receptors. **Annual Review Cell Developmental Biology**, **22**: 409–437.

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

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

XU, J.; DREW, P. D. 2007. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists suppress the production of IL-12 family cytokines by activated glia. **Journal Immunology**, **178 (3)**: 1904-1913.

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

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. 2010. Centrally administered pertussis toxin inhibits microglia migration to the spinal cord and prevents dissemination of disease in and EAE mouse model. **PLoS ONE**, **5 (8)**: E12400.

ZEKKI, H.; FEINSTEIN, D. L.; RIVEST, S. 2002. The clinical course of experimental autoimmune encephalomyelitis is associated with a profound and sustained transcriptional activation of the genes encoding toll-like receptor and CD14 in the mouse CNS. **Brain Pathology**, **12 (3)**: 308-319.

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

ZHU, B.; BANDO, Y.; XIAO, S.; YANG, K.; ANDERSON, A. C.; KUCHROO, V. K.; KHOURY, S.L. 2011. CD11b⁺Ly-6C^{hi} suppressive monocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Immunology**, **179 (8)**: 5228- 5237.

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