



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA

Viano Wyallison de Souza

**Avaliação da resposta imunológica inicial no modelo de
Encefalomielite Autoimune Experimental**

Juiz de Fora

2016

VIANO WYALLISON DE SOUZA

**Avaliação da resposta imunológica inicial no modelo de Encefalomielite
Autoimune Experimental**

Trabalho de Conclusão de Curso
(TCC) apresentado ao curso de
graduação em Farmácia da
Universidade Federal de Juiz de
Fora – UFJF, para obtenção do
título de Farmacêutico.

Orientadora: Ana Paula Ferreira

Co-orientadora: Sandra Bertelli Ribeiro de Castro

Juiz de Fora

2016

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

Souza, Viano Wyallison.

Avaliação da resposta imunológica inicial no modelo de Encefalomielite Autoimune Experimental / Viano Wyallison Souza. -- 2016.

57 p. : il.

Orientadora: Ana Paula Ferreira

Coorientadora: Sandra Bertelli Ribeiro de Castro

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica, 2016.

1. : Encefalomielite Autoimune Experimental. 2. Esclerose Múltipla. 3. IL1- β . 4. TNF- α . 5. receptores Toll Like. I. Ferreira, Ana Paula, orient. II. Bertelli Ribeiro de Castro, Sandra, coorient. III. Título.

Avaliação da resposta imunológica inicial no modelo de Encefalomielite Autoimune Experimental

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado ao curso de graduação em Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF, para obtenção do título de Farmacêutico.

Data de Aprovação: 08 de Julho de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Ana Paula Ferreira (Orientadora)
Universidade Federal de Juiz de Fora

Msc. Marcilene Gomes Evangelista Ambrósio
Universidade Federal de Juiz de Fora

Msc. Luan Cristian da Silva
Universidade Federal de Juiz de Fora

Juiz de Fora

2016

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado saúde e força para superar todas as dificuldades desta grande jornada.

A minha mãe Evangelina e ao meu pai Pedro, pelo exemplo de dignidade, por sempre confiarem em mim, por todo o apoio e pelo seu amor incondicional.

A minha irmã Aline, pela amizade, pelo seu carinho, afeto, tenho muito orgulho em ser seu irmão.

A minha avó Noêmia que apesar de nunca ter frequentado uma escola foi a pessoa com quem mais aprendi na vida, vou sempre levá-la em meu coração.

A minha namorada Paula, pelo companheirismo, amizade, carinho e por ter deixado o meu mundo mais alegre e otimista.

A minha madrinha Belmira, por sempre me tratar com muito carinho e sempre se disponibilizar em ajudar.

Ao meu professor Marcelo, por acreditar em mim quando já tinha perdido a esperança.

Aos amigos de faculdade, pela amizade sincera, pelos momentos de diversão.

A Prof. Dra. Sandra Bertelli Ribeiro de Castro, pelo aprendizado, pelos grandes ensinamentos e por ter contribuído para o meu crescimento como graduando de farmácia.

A Prof. Dra. Ana Paula Ferreira, minha sincera gratidão por ter aceitado o meu convite para ser minha orientadora, pela oportunidade de aprendizado.

“Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá.”

(Ayrton Senna)

RESUMO

A Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE) é o modelo animal da doença humana esclerose múltipla, que se caracteriza por inflamação do sistema nervoso central com significativa destruição da bainha de mielina mediada predominantemente por linfócitos T. As citocinas pró inflamatórias IL-1 β e o TNF- α apresentam importantes ações na EAE. O papel dos toll-like receptors (TLRs) nesta doença é ainda controverso com resultados contraditórios na literatura. Assim avaliamos o papel de alguns TLRs do tipo TLR3, TLR4 e TLR9. O presente trabalho teve o objetivo de avaliar a resposta imunológica inicial no modelo de EAE. Camundongos C57BL/6 foram imunizados por via subcutânea, com emulsão contendo 100 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ suplementado com 4 mg/mL de *M. tuberculosis*. No dia da imunização e 48 horas após, os animais receberam 300ng de toxina pertussis por via intraperitoneal, e após isto foram divididos em três grupos, MOG +, MOG - e controle não imunizado, avaliados nos 2º, 4º e 7º dias pós-imunização. Todos os animais do grupo MOG + desenvolveram sinais clínicos no 11º dia pós-imunização. Ocorreu acentuada perda da massa corporal nos animais do grupo MOG + quando comparados com o grupo controle não imunizado entre os dias 12 e 17 pós-imunização. Foi possível observar uma resposta periférica caracterizada pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias, tais como, IL1- β e TNF- α no 2º, 4º ou 7º dia após a imunização nos grupos MOG + e MOG - em relação ao grupo não imunizado o que pode sugerir o preparo do sistema imune periférico mediante os estímulos recebidos. Nos linfonodos, os grupos MOG - e MOG + apresentaram um número significativo de células MHCII⁺F4/80⁺CD11c⁺ expressando TLR4 quando comparados ao controle não imunizado pois acredita-se que o *Mycobacterium tuberculosis* presente no CFA seja capaz de ativar TLR4. Foi constatado que na medula espinhal o grupo MOG + foi o que apresentou um relevante número de infiltrado inflamatório, células MHCII⁺F4/80⁺CD11c⁺ e células B MHCII⁺ CD19⁺, expressando TLR3, TLR4 e TLR9 em comparação ao grupo MOG - e ao controle não imunizado, levando a uma manutenção de uma resposta imune encefalitogênica dentro do SNC. No presente trabalho foi possível relacionar os TLRs, com o desenvolvimento da EAE, e mostrar alterações da resposta imunológica mediante a presença do peptídeo da mielina. Entretanto, mais estudos precisam ser desenvolvidos para a compreensão dos mecanismos imunológicos envolvidos na fase inicial da doença.

Palavras-chave: Encefalomielite Autoimune Experimental, Esclerose Múltipla, IL1- β , TNF- α e receptores Toll Like.

ABSTRACT

Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is an animal model for the human disorder multiple sclerosis, typified by central nervous system inflammation and T-lymphocyte mediated myelin sheath damage. The pro-inflammatory cytokines IL-1 and TNF- α play an important role in EAE. The toll-like receptors (TLRs) role in this disorder is still controversial and literature shows conflicting results. Therefore, the role of some TLRs was assessed, that being TLR3, TLR4 and TLR9. The aim of this study was to evaluate the initial immune response in EAE. C57BL/6 mice were subcutaneously immunized with 100 μ g of 4 mg/mL *M. tuberculosis* MOG₃₅₋₅₅ peptide. Both at immunization day and 48 hours afterwards the mice received intraperitoneally 300ng of pertussis toxin, and after that were divided in three groups, MOG +, MOG - and non-immunized control group, evaluated 2, 4 and 7 days post-immunization. All mice in MOG + group developed clinical signs at day 11 post-induction. A sharp loss of body mass occurred in MOG + group mice between days 12 and 17 post-immunization when compared to non-immunized control group. A peripheral response could be observed by the increase of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 and TNF- α at days 2, 4 and 7 post-immunization in MOG + and MOG - groups when compared to non-immunized group, which may suggest peripheral immune system triggering upon the received stimuli. In MOG - and MOG + groups lymph nodes a significant number of MHCII⁺F4/80⁺CD11c⁺ cells expressing TLR4 was observed when compared to non-immunized control group since *Mycobacterium tuberculosis* presence in CFA is believed to trigger TLR4. The MOG + group showed a relevant spinal cord inflammatory infiltrate with MHCII⁺F4/80⁺CD11c⁺ cells and MHCII⁺ CD19⁺ B cells expressing TLR3, TLR4 and TLR9 when compared to both MOG - and control groups, leading to encephalitogenic immune response maintenance in the central nervous system. In this study it was possible to relate TLRs with EAE development, and to show immune response changes in presence of the myelin peptide. However, more studies need to be developed to comprehend the immune mechanisms involved in the early stage of the disorder.

Keywords: Experimental autoimmune encephalomyelitis, multiple sclerosis, IL1- β , TNF- α , toll-like receptors.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição dos animais em grupos	31
Tabela 2	Escala neurológica clínica de avaliação da EAE	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição mundial da prevalência da EM (Fonte: OMS, 2008)	16
Figura 2	Receptores Toll Like na Esclerose Múltipla (HERNANDEZ; BAXTER, 2013)	20
Figura 3	Hipótese da patogenia da Esclerose Múltipla e do modelo EAE (GIULLANI; YOUNG, 2003)	22
Figura 4	Avaliação do escore clínico e massa corporal	35
Figura 5	Avaliação da concentração das citocinas TNF- α e IL1- β em homogenato de linfonodos inguinais e medula espinhal	37
Figura 6	Avaliação do número de células MHCII ⁺ F4/80 ⁺ CD11c ⁺ expressando TLR nos linfonodos inguinais	38
Figura 7	Avaliação do número de células B MHCII ⁺ CD19 ⁺ expressando TLR nos linfonodos inguinais	39
Figura 8	Avaliação do número de células MHCII ⁺ F4/80 ⁺ CD11c ⁺ expressando TLR na medula espinhal	40
Figura 9	Avaliação do número de células B MHCII ⁺ CD19 ⁺ expressando TLR na medula espinhal	41

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Principais fatores externos envolvidos no desencadeamento da EM	18
-----------------	---	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACK	Acetato quinase
APCs	Células apresentadoras de antígenos (do inglês “antigen presenting cell”)
CCL	Cysteine-Cysteine Chemokine Ligand
CFA	Adjuvante completo de Freund (do inglês “Freund's Complete Adjuvant”)
CBR	Centro de Biologia da Reprodução
COBREA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DAMPs	Padrões moleculares associados a tecidos danificados (do inglês “Damage - associated molecular patterns”)
d.p.i	Dia pós-imunização
EAE	Encefalomielite Autoimune Experimental
BHE	Barreira hemato-encefálica
EBV	Vírus Epstein-Barr
ELISA	Ensaio imunoenzimático (do inglês “Enzyme-linked immunosorbent assay”)
EM	Esclerose Múltipla
NO	Óxido nítrico
FITC	Isotiocionato de fluoresceína
HLA	Antígeno leucocitário humano (do inglês “Human leukocyte antigen”)
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleucina
I.P	Via intraperitoneal
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos – 1 (do inglês “ monocyte chemoattractant proteine 1”)
mg	Miligrama

MHC II	Complexo principal de histocompatibilidade (do inglês “major histocompatibility complex”)
MOG	Glicoproteína mielina-oligodendrócito (do inglês “Myelin-Oligodendrocyte Glycoprotein”)
nm	Nanômetros
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAMPs	Padrões moleculares associados ao patógeno (do inglês “Damage-associated molecular pattern molecules”)
IRAK	Kinase associada ao receptor de IL-1 (do inglês “IL-1 receptor-associated Kinase”)
TRAF	Fator associado ao receptor 6 de TNF (do inglês “TNF-R-associated factor-6”)
NF- κ B	Fator nuclear κ B (do inglês “nuclear factor κ B”)
TRIF	Adaptador contendo domínio TIR indutor de interferon β (do inglês “TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β ”)
Células NK	Células Natural Killer (do inglês: Natural Killer)
PBS	Tampão salina fosfato (do inglês “phosphate buffered saline”)
PE	Ficoeritrina (do inglês “Phycoerythrin”)
PerCP	Clorofil peridina
PP	Primária-progressiva
PR	Progressiva-recorrente
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrão (do inglês “Pattern Recognition Receptors”)
RNM	Ressonância Nuclear Magnética
ROS	Espécies reativas de oxigênio (do inglês “Reactive Oxygen Species”)
rpm	Rotações por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RR	Remitente-recorrente
RT-PCR	Reação em cadeia da Polimerase com transcrição reversa (do inglês “Reverse transcription polymerase chain reaction”)
S.C	Via subcutânea

SFB	Soro Fetal Bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
SP	Secundária-progressiva
TGF- β	Fator transformador do crescimento-beta (do inglês “transforming growth factor beta”)
Th1	T helper 1
Th 17	T helper 17
TJ	Junções de oclusão (do inglês “Tight junction”)
TLRs	Receptores Toll-like (do ingles “ <i>Toll-like</i> receptors”)
TMB	3, 3', 5, 5' tetrametilbenzidina
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa (do inglês “tumoral necrosis factor alpha”)
Treg	Linfócito T regulatório
UA	Uracila-Adenina
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
°C	Graus Celsius
μ g	Micrograma

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Características gerais da Esclerose Múltipla	15
1.2	Influências genéticas e ambientais na patogenia da EM	17
1.3	Encefalomielite Autoimune Experimental	18
1.4	Ativação Periférica dos Linfócitos T na EAE	20
1.5	A Influência dos Receptores do Tipo Toll no desenvolvimento e progressão da EAE.	23
1.6	As ações da IL1-β e TNF-α na Encefalomielite Autoimune Experimental e na Esclerose Múltipla	25
2	OBJETIVOS	29
2.1	Objetivo Geral	29
2.2	Objetivos Específicos	29
3	MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1	Animais	30
3.2	Delineamento Experimental	30
3.3	Avaliação do Escore Clínico e Massa Corporal	31
3.4	Eutanásia dos animais e obtenção dos órgãos e células	32
3.5	Quantificação de citocinas por ELISA	33
3.6	Isolamento e preparação de células mononucleares dos linfonodos inguinais e medula espinhal	33
3.7	Avaliação de marcadores celulares por Citometria de Fluxo	34
3.8	Análise Estatística	34
4	RESULTADOS	35
4.1	Escore clínico e Massa Corporal	35

4.2	Concentração das citocinas TNF-α E IL1-β em homogenato de linfonodos inguinais e medula espinhal	35
4.3	Células MHCII⁺F4/80⁺CD11c⁺ E células B MHCII⁺CD19⁺ expressando TLR nos linfonodos inguinais	37
4.4	Avaliação do número de células MHCII⁺F4/80⁺CD11c⁺ E células B MHCII⁺CD19⁺ expressando TLR na medula espinhal	39
5	DISCUSSÃO	42
6	CONCLUSÃO	45
	REFERÊNCIA	47

1 INTRODUÇÃO

1.1 Características gerais da Esclerose Múltipla

A Esclerose Múltipla (EM) é caracterizada como um processo inflamatório crônico desmielinizante do Sistema Nervoso Central (SNC), sendo na maioria dos casos grave e incapacitante, afetando cerca de um milhão de pessoas entre 17 e 65 anos, atingindo duas vezes mais mulheres do que homens (SOSPEDRA; MARTIN, 2005; GOVERMAN, 2009). Cerca de 60% dos indivíduos com EM tornam-se incapacitados em aproximadamente 20 anos após o início da doença, o que influencia diretamente na qualidade de vida do paciente e ocasionando um elevado custo financeiro para a sociedade (SOSPEDRA; MARTIN, 2005; GOVERMAN, 2009).

A doença manifesta-se como uma série de surtos alternados pelos períodos de remissão parcial ou completa, muitas vezes seguidos de uma fase de progressão crônica (PRAT; ANTEL, 2005; BRUCK; STADELMANN, 2005; HAFLE et al., 2005). Os surtos tipicamente consistem de um sintoma ou combinação de sintomas sensoriais, neurite óptica, sintomas do tronco cerebral (diplopia e ataxia), sintoma de Uhthoff (piora sintomática com o aumento da temperatura corpórea) e disfunção do esfíncter (WINGERCHUK et al., 2001).

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

As variadas formas clínicas observadas no curso da EM podem ser explicadas pela desmielinização, grau de inflamação, remielinização e neurodegeneração (PETERSON et al., 2007). Na EM é observada a presença de infiltrados inflamatórios que estão associados a destruição da bainha de mielina presente nos oligodendrócitos e nos axônios de neurônios, que leva a uma alteração da condução saltatória dos impulsos nervosos, determinando inibição de 5 a 10% da propagação elétrica normal e bloqueios permanentes da condução elétrica

(SCOLDING; FRANKLIN, 1998). Além disso, edema e produtos da resposta inflamatória, como citocinas e quimiocinas, liberados localmente pelas células imunes ativadas, também são capazes de alterar a funcionalidade dos axônios, reduzindo a condução dos impulsos nervosos (SCHMIDT, 1999).

Portanto, é de vital importância à integração de critérios clínicos, laboratoriais do líquido cefalorraquidiano (LCR) e imagem de ressonância nuclear magnética (RNM) para o diagnóstico de EM mesmo na ausência de um marcador biológico específico (BRUCK; STADELMANN, 2005; HAUSER, 2005).

A EM é uma doença autoimune que apresenta uma grande variação de prevalência no mundo. Segundo o relatório da Federação Internacional de Esclerose Múltipla para a Organização Mundial de Saúde (OMS), realizado em 2008, ocorre maior incidência da doença em países da Europa e América do Norte (WHO, 2008). Por sua vez a América do Sul é considerada região de baixa prevalência (menor que 5 casos por 100.000 habitantes). Estes dados estão de acordo com os primeiros estudos sobre a epidemiologia da EM que sempre relacionou prevalência e gradiente latitudinal, ocorrendo maior prevalência em áreas localizadas acima da linha do Equador.

No Brasil, observa-se maior prevalência na região Sudeste de 12 a 18 casos por 100.000 habitantes e na região Sul que apresenta uma variação entre 14 a 27 casos, para 100.000 habitantes, o que sugere a existência do fator latitudinal (CALEGARO; SATO, 2011; RIBEIRO et al., 2011).

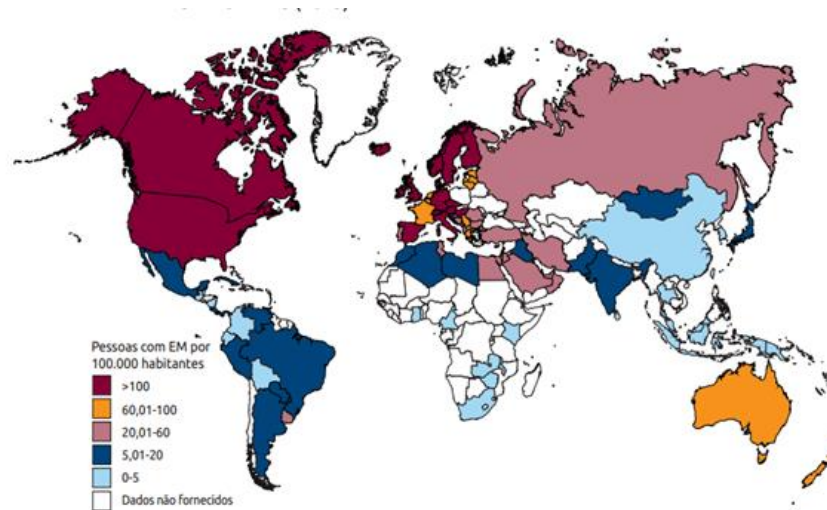


Figura 1 - Distribuição mundial da prevalência da EM (Fonte: OMS, 2008)

1.2 Influências genéticas e ambientais na patogenia da EM

A Esclerose Múltipla parece não ter um agente patogênico específico para seu desencadeamento, ou este agente permanece ainda desconhecido, contudo dados epidemiológicos suportam a hipótese de etiologia multifatorial (SADOVNICK et al., 1996; KANTARCI et al., 2002), com a participação de fatores exógenos aliados a uma predisposição determinada geneticamente (EBERS et al., 1995; HOLMES et al., 2005), e fatores epigenéticos também considerados importantes na etiopatogenia da EM.

A associação entre doenças autoimunes e genes do MHC reflete o importante papel dessas moléculas no direcionamento da resposta imune. Por seu papel na apresentação de antígenos, o MHC estabelece uma ligação entre a resposta inata e a resposta adaptativa (GERMAIN, 1994). O complexo de histocompatibilidade principal humano, MHC, é composto por um conjunto de genes altamente polimórficos, denominados complexo HLA (*human leukocyte antigen*), e compreende mais de 120 genes funcionais, dos quais cerca de 20% estão associados à imunidade. No homem, esses genes situam-se no cromossomo 6 e, tradicionalmente, são divididos em classes I, II e III (KLEIN; SATO, 2000). As moléculas de classe I estão presentes na superfície de todas as células nucleadas, enquanto as de classe II são encontradas basicamente nas Células Apresentadoras de Antígenos (APCs) como macrófagos, células dendríticas e linfócitos B. Todas as moléculas de MHC presentes na superfície de uma célula têm um peptídeo associado. Embora as moléculas de classe I e II apresentem características estruturais diversas, ambas são expressas como heterotrímeros em que duas cadeias são da molécula de MHC e a terceira é o peptídeo apresentado aos linfócitos T (GERMAIN, 1994).

As moléculas HLA correspondente humano do MHC de classe I e II são importantes porque influenciam a formação do repertório de células T e o padrão de reatividade imunológica (ZIPP et al., 2000). Como a maior parte dos genes do complexo HLA são altamente polimórficos, as variantes dos seus alelos são candidatas em potencial na associação com susceptibilidade e proteção às doenças (ZIPP et al., 2000). Contudo a susceptibilidade para EM é provavelmente determinada pela interação de vários genes e isto tem levado a inúmeros estudos com o objetivo de estabelecer *loci* específicos implicados na susceptibilidade à EM ou na regulação da resposta imune e codificação de proteínas estruturais da mielina (KELLARWOOD et al., 1995; POULY; ANTEL, 1999).

Entre os fatores ambientais, muitos estudos citam que fatores sociais, nutrição, exposição à luz solar, exercício, estresse e condições de higiene podem participar no

desencadeamento da doença e modular a taxa de progressão (JELINECK; HASSED, 2007; YOUNG, 2011). No Quadro 1 estão resumidos os principais fatores externo que podem estar envolvidos no desencadeamento da EM.

Quadro 1 - Principais fatores externos envolvidos no desencadeamento da EM.

FATORES AMBIENTAIS	EVIDENCIA DA RELAÇÃO DOS FATORES AMBIENTAIS COM A EM
EXPOSIÇÃO À LUZ SOLAR	Em locais de baixa exposição solar há maior incidência de EM, o que poderia estar relacionado a baixa produção de vitamina D interferindo com a atividade imunológica. (ASCHERIO et al., 2010).
ESTRESSE	Mostrou-se que pacientes expostos a fatores estressores tais como: conflitos, perdas, doenças variadas, entre outros, apresentaram uma evolução mais rápida da doença; sendo, portanto, considerada como possível fator de risco (GASPERINI et al., 1995).
AGENTES INFECCIOSOS	Entre os agentes infecciosos mais estudados com influência na EM está o vírus Epstein-Barr (EBV). Porém os estudos nesse sentido são difíceis, visto que o EBV afeta cerca de 95% da população adulta, tornando difícil estabelecer a relação do EBV com EM. Outros agentes infecciosos têm sido relacionados dentre eles estão a Clamydia e alguns outros vírus, tais como: da Poliomielite (ASCHERIO; MUNGER, 2007), Adenovírus, do distemper canino, da varicela zoster e Papovavírus (COOK et al., 1995). Apesar destas hipóteses, não foi estabelecida relação causal entre nenhum agente infeccioso e doença (FRANKLIN; LORENE, 2003).
TRAUMA	Apesar de controverso, e haver escassez de estudos controlados e sistematizados, parece haver relação entre trauma físico e EM, porém não é possível afirmar categoricamente esta relação (MACHADO, SUZANA, 2012).
GESTAÇÃO	Estudos apontam que o risco de recidiva nos primeiros seis meses do puerpério é três vezes maior que na gestação (CONFAVREUX et al., 1998).
TABAGISMO	A incidência de EM nas mulheres tabagistas (acima de 15 cigarros/ dia) é 1,8 maior que em mulheres não fumantes. Além disso, sabe-se que as mulheres tabagistas portadoras de EM tem maior risco de progredir da forma remitente-recorrente para a forma secundariamente progressiva (MACHADO, SUZANA, 2012).

1.3 Encefalomielite Autoimune Experimental

A Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE) é doença inflamatória do SNC induzida em animais de laboratório através da imunização ativa com peptídeos da mielina ou através da transferência adotiva de células T CD4⁺ reativas a mielina. O modelo de EAE é amplamente usado como estudo animal de esclerose múltipla e como modelo de doença autoimune órgão específica (KROENKE et al., 2008).

A EAE pode ser induzida por injeção subcutânea (s.c) de peptídeos purificados de diferentes componentes da bainha de mielina, como proteína básica da mielina (MBP), proteína proteolipídica (PLP) e mieloglicoproteína de oligodendrócitos (MOG). A transferência de células T CD4⁺ específicas também é capaz de induzir a doença em linhagens de roedores e algumas espécies de primata (BERNARD et al., 1997; BRADL; HOHLFELD, 2003; COSTA et al., 2003).

A resposta imune na EAE é iniciada na periferia pela injeção do antígeno associado ao adjuvante completo de Freud (CFA) e rapidamente desenvolve um processo inflamatório no SNC em função do peptídeo da mielina presente na emulsão (GENAIN et al., 1999; COSTA et al., 2003).

Na EAE a doença pode ser evidenciada através de diferentes sintomas, como paralisia de cauda e de patas traseiras dos camundongos ou ratos submetidos à indução. Entretanto, as formas clínicas da EAE podem variar de acordo com o protocolo utilizado para a indução, ressaltando diferenças entre os modelos animais assim como ocorre na EM (JOHNS et al., 1995; JOHNS; BERNARD, 1999; BRADL; HOHLFELD, 2003). A indução por MBP desenvolve a forma PP da EAE e através de sequências peptídicas do proteolípídeo PLP, observa-se a forma SP. A MBP é um dos principais componentes proteicos da mielina, correspondendo a 30% da mielina total, e está presente no sistema nervoso periférico (SNP) e no sistema nervoso central (SNC). Algumas sequências peptídicas são consideradas mais encefalitogênicas em alguns grupos de pacientes EM (WARREN et al., 1995; BRADL; HOHLFELD, 2003). O PLP é uma molécula hidrofóbica expressa exclusivamente no SNC, como uma proteína transmembranar (SCHMIDT, 1999; KRAMER et al., 2001).

A glicoproteína MOG é expressa apenas no SNC e está localizada nos corpos celulares dos oligodendrócitos e na camada mais externa da bainha de mielina (KROEPFL et al., 1996). A MOG, com peso molecular de apenas 60KDa, é o menor componente mielínico, representando apenas 0,01% a 0,05% da proteína total. A sequência de aminoácidos da MOG é altamente conservada entre roedores e humanos, com aproximadamente 89% de homologia entre as espécies (VAN NOORT et al., 1997; ROSBO; BEN-NUM, 1998).

A imunização de camundongos C57BL/6 pelo peptídeo MOG₃₅₋₅₅ se caracteriza por lesões inflamatórias e desmielinizantes em nervo óptico, quiasma e substância branca do cérebro e medula espinhal (GARDINIER et al., 1992). Os infiltrados inflamatórios são perivasculares constituídos principalmente por macrófagos, linfócitos T e linfócitos B, ocorre

também algum grau de resposta humoral com formação de títulos de anticorpos anti-MOG. O sistema nervoso periférico é poupado (BERNARD et al., 1997).

Durante anos a EAE foi considerada como doença de padrão exclusivamente Th1 (BETTELLI; KUCHROO, 2005). Entretanto, em 2005 a caracterização de um novo subtipo de células T produtora de interleucina 17 (IL-17) elevou o entendimento da fisiopatologia da EAE e de outras doenças auto-imunes permitindo a compreensão de vários mecanismos envolvidos (HARRINGTON et al., 2005; LANGRISH et al., 2005).

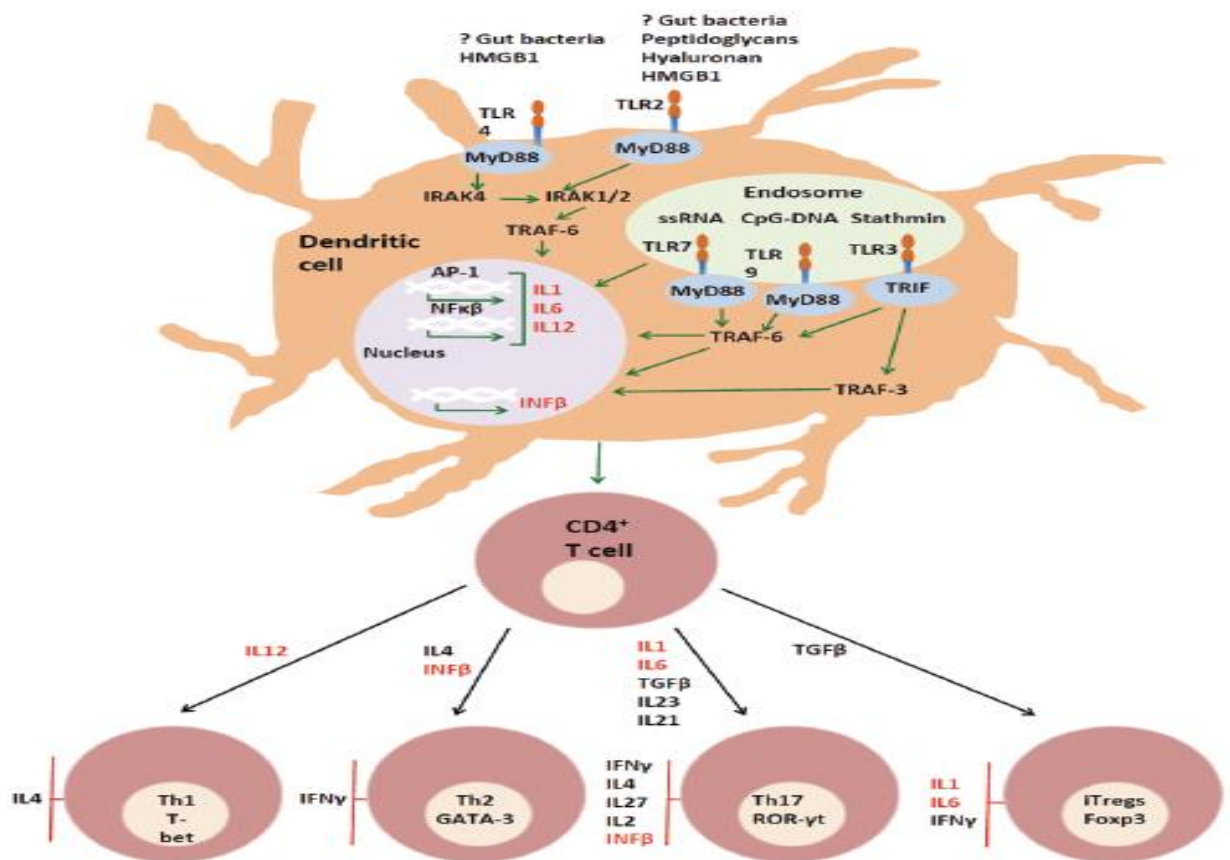


Figura 2 - Receptores Toll Like na Esclerose Múltipla (HERNANDEZ; BAXTER, 2013).

1.4 Ativação Periférica dos Linfócitos T na EAE

Como relatado anteriormente, a EAE é induzida por uma emulsão que é injetada de forma subcutânea no animal (LAVI; CONTANTINESCU, 2005). Nos linfonodos que drenam a emulsão ocorre a ativação das APCs que captam os antígenos da mielina utilizados, por exemplo, MOG₃₅₋₅₅ e os apresentam via moléculas de MHC de classe II. Essas APCs também expressam moléculas co-estimuladoras como B7-1 o que permite a ativação de linfócitos T reativos à antígenos da mielina (LAVI; CONTANTINESCU, 2005). A importância da co-

estimulação na EAE foi demonstrada em estudos usando anticorpos bloqueadores destas moléculas, dessa forma, preveniram o desenvolvimento da doença.

A apresentação de antígenos associados às moléculas de MHC de classe II também é importante na EAE tanto nos linfonodos drenantes quanto dentro do SNC, pois foi demonstrado que animais que não expressam MHC de classe II no SNC são resistentes a indução de EAE (HICKEY et al., 1991; TOMPKINS et al., 2002).

Uma vez ativados nos linfonodos, os linfócitos precisam migrar para o SNC atravessando a barreira hemato-encefálica (BHE). No processo de migração celular é importante a atuação das selectinas que são um grupo de glicoproteínas que se ligam a grupos específicos de carboidratos. O papel das selectinas tem sido muito estudado, sugerindo uma importante participação no recrutamento celular, principalmente no processo de rolamento (KERFOOT; KUBES, 2002). Na EAE a L-selectina é importante nesse processo (GREWAL et al., 2001). A etapa de adesão ocorre a partir da indução de moléculas de adesão celular (ICAM-1 e VCAM-1) no endotélio e sua interação com ligantes específicos expressos na membrana dos leucócitos, as integrinas (LFA-1 e VLA-4). A forte adesão entre leucócitos e as células endoteliais é promovida pela indução de ICAM-1 no endotélio e por uma mudança conformacional nas moléculas de integrinas pela ação das quimiocinas, levando a ativação dessas moléculas (KUBES, 2002; KERFOOT; KUBES, 2002). O estágio final de extravasamento para o tecido constitui a diapedese, que requer uma reorganização do citoesqueleto. Por fim, para chegar ao parênquima do SNC, os leucócitos precisam passar pela membrana basal, sendo necessário, nesse caso, a atividade proteolítica de enzimas como as metaloproteinases. A importância da MMP-9 já foi demonstrada em animais com EAE (ESPARZA et al., 2004) e também existem evidências de sua importância na EM (COSSINS et al., 1997).

Para que os linfócitos sejam atraídos para o SNC é necessária a ação das quimiocinas. Elas têm papel chave na formação do infiltrado celular na EAE (GLABINSKI et al., 1995; TANI et al., 1996). A CCL2, também conhecida como MCP-1 (do inglês: *monocyte chemoattractant proteina 1*), é produzida por astrócitos (GLABINSKI et al., 1995; TANI et al., 1996). Seu receptor CCR2 tem dupla função no desenvolvimento da doença atuando simultaneamente no recrutamento de linfócitos e monócitos para o SNC e intensificando a resposta Th1 (FIFE et al., 2000; IZIKSON et al., 2000). No SNC, células residentes, como astrócitos, oligodendrócitos, microglia e neurônios são capazes de expressar receptores funcionais de quimiocinas. Entretanto, essa expressão é, preferencialmente, induzida por um estímulo inflamatório (BIBER et al., 2002). Por exemplo, trabalhos têm mostrado que as

quimiocinas CCL2, CCL3, CXCL10 e CCL21 podem ser induzidas à expressão em neurônios sob condições de degeneração neuronal e, que essas moléculas são capazes de atrair leucócitos que migram através da BHE. Esses dados mostram uma possível participação das quimiocinas na ativação de uma resposta inflamatória crônica dentro do SNC (BIBER et al., 2002; BANISOR et al., 2005). No modelo EAE foi mostrado que camundongos knockout para CCR2 não desenvolvem sinais da doença (BIBER et al., 2002).

O receptor de CCL2 (CCR2) está presente em componentes da BHE (astrócitos e células endoteliais) e células do próprio SNC sugerindo que esta molécula participe não apenas no recrutamento de células, mas também modulando o processo inflamatório e a alteração na permeabilidade da BHE (TANUMA et al., 1996; ANDJELKOVIC et al., 1999). O efeito da CCL2 na seletividade da BHE pode ser direto, atuando assim nas células endoteliais do cérebro, reduzindo a expressão de proteínas de junção oclusiva (occludina, ZO-1, ZO-2 e claudina-5) (STAMATOVIC et al., 2003; STAMATOVIC et al., 2005), ou indiretamente induzindo a expressão de outras moléculas inflamatórias pelas próprias células endoteliais, astrócitos e leucócitos.

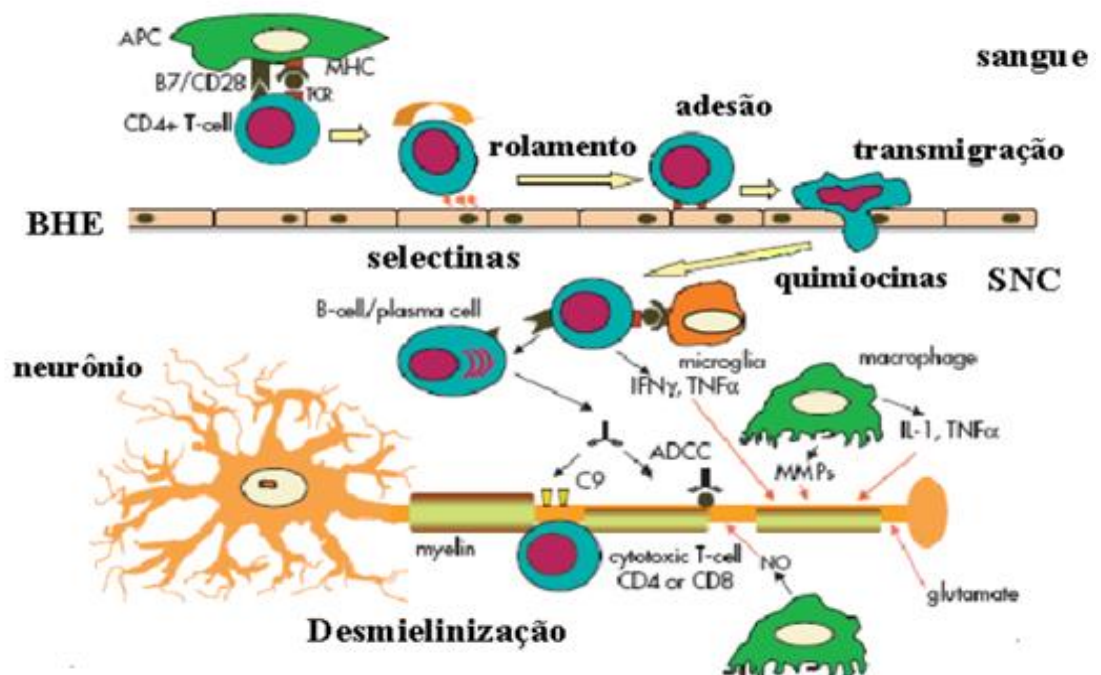


Figura 3 – Hipótese da patogênese da Esclerose Múltipla e do modelo EAE. (GIULLANI; YOUNG, 2003).

As células T, uma vez dentro do SNC, são reativadas formando o complexo trimolecular – MHC Classe II, TCR e o antígeno específico. As células Thelper (Th) ativadas podem apresentar perfil Th1, Th17, Th2 ou Treg de acordo com o tipo de citocinas presentes durante a apresentação antigênica, pelo tipo de peptídeo estimulante, pela coestimulação recebida e

pelos fatores de transcrições envolvidos. A reativação linfocitária induz à produção de diferentes citocinas e mediadores inflamatórios, como prostaglandinas, radicais livres e óxido nítrico (NO) promovendo estresse oxidativo (DYMENT et al., 2004).

1.5 A Influência dos Receptores do Tipo *Toll* no desenvolvimento e progressão da EAE.

A imunidade inata é a primeira linha de defesa que protege o hospedeiro de patógenos invasores, sendo fundamental no desenvolvimento do modelo experimental de EAE (LAVI; CONTANTINESCU, 2005). A resposta imune inata começa com o reconhecimento de Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), provocando a transdução de sinais intracelulares, que culmina na transcrição de vários genes que podem facilitar no controle eficiente dos patógenos (MEDZHITOV; JANEWAY, 1997).

Entre as classes funcionais distintas de PRRs, receptores semelhantes ao Toll (TLR) são intensamente estudados devido à sua capacidade de reconhecer uma grande quantidade de PAMPs provenientes de uma variedade de patógenos (KAWAI; AKIRA, 2009).

De forma geral, os TLRs funcionam nos mamíferos como “sensores de perigo”. Eles são ativados pela presença de sinais de perigo, por exemplo, pela presença de lipopolissacarídeos (LPS) das bactérias gram-negativas ou peptidoglicano das bactérias gram-positivas e estão estrategicamente localizados em células epiteliais do sistema imune (ABBAS; LICHTMAN, 2012).

Os TLRs são expressos em diversas células, tais como, macrófagos, células dendríticas, células B, células da glia (microglia e astrócitos), neurônios, célula vascular endotelial, plaquetas, células epiteliais e adiposas, células do músculo esquelético, células β pancreáticas, hepatócitos e células T (BSIBSI et al., 2002; TAKEDA; AKIRA, 2004; KABELITZ, 2007; LAMPROPOULOU et al., 2008). Quando ativados estimulam a expressão de genes que codificam proteínas importantes na resposta imune inata como citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1 e IL-12), moléculas de adesão (E-selectinas) e enzimas envolvidas com a eliminação de bactérias como a óxido nítrico sintetase induzida (ABBAS; LICHTMAN, 2012). O TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10 e possivelmente o TLR11, são expressos na superfície celular, enquanto que o TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9, são expressos em endossomos intracelulares (TAKEDA; AKIRA, 2004).

O reconhecimento de PAMPs pelos TLRs cognatos ativa a via do MYD88 que resulta no recrutamento da proteína IRAK (do inglês: IL-1 receptor-associated Kinase) que se autofosforila, dissocia-se do MYD88 e ativa a proteína TRAF-6 (do inglês: TNF-R-associated factor-6) que, por sua vez, leva a ativação do NF- κ B (do inglês: nuclear factor κ B), fator de transcrição responsável pela expressão dos genes relacionados às ações dos TLRs (ABBAS; LICHTMAN, 2012).

Camundongos MYD88^{-/-} são resistentes ao choque induzido por LPS (KAWAI et al., 1999) e também não apresentam resposta a estimulação com peptidoglicanos (TAKEUCHI et al., 2000), flagelina, componentes virais (HEMMI et al., 2002) e outras moléculas de microorganismos que comumente ativam respostas da imunidade inata (HACKER et al., 2000; HAYASHI et al., 2001). No entanto, alguns TLRs são capazes de ativar outras proteínas e desencadear respostas a micro-organismos por vias independentes da proteína MYD88 (ABBAS; LICHTMAN, 2012). A produção de citocinas inflamatórias depende principalmente da MYD88, no entanto, os TLRs 3 e 4 são capazes de estimular a produção de IFN- β através de via alternativa que utiliza como adaptador citoplasmático a proteína TRIF β (do inglês “TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β ”) (YAMAMOTO et al., 2002). O TLR3 utiliza exclusivamente esta via, enquanto TLR4 utiliza ambas, TRIF e MYD88 (FITZGERALD et al., 2003).

O progressivo interesse pelos TLRs levou aos estudos desses receptores nas doenças autoimunes, inclusive na EAE. Prinz e colaboradores (2006), estudaram os TLRs 2, 9 e a proteína MYD88 no modelo de EAE induzida por MOG₃₅₋₅₅. Animais TLR2^{-/-} mostraram evolução clínica idêntica a dos animais WT, os TLR9^{-/-} apresentam EAE menos agressiva e de início clínico mais tardio em relação aos controles e os MYD88^{-/-} foram completamente resistentes à indução da doença. O estudo conclui que a ativação do TLR9 por patógenos pode ser responsável pelas exacerbações na EM provocadas por infecções.

O TLR4 também foi estudado na EAE, Kerfoot e colaboradores (2004), mostraram que camundongos TLR4^{-/-} apresentam resistência parcial a indução da doença e que a toxina pertussis, usada nos protocolos de indução da EAE, age tanto por mecanismos dependentes quanto independentes de TLR4. A expressão dos TLRs por uma variedade de células é elevada no SNC na EAE (ZEKKI et al., 2002; PRINZ et al., 2006; XU; DREW, 2007). Agentes que modulem especificamente as vias de sinalização TLRs podem ser efetivos no tratamento da EAE e EM.

1.6 As ações da IL1- β e TNF- α na Encefalomielite Autoimune Experimental e na Esclerose Múltipla

A interleucina-1 (IL-1) é uma família de citocinas que apresentam uma importante função na iniciação da cascata de respostas imunoinflamatórias através da ligação do sistema imune inato e adquirido (DUJMOVIC et al., 2009).

A família interleucina-1 abrange um grupo de três diferentes polipeptídios são eles os dois agonistas, a interleucina-1 α (IL-1 α) e a interleucina-1 β (IL-1 β) e um antagonista, a proteína antagonista do receptor de interleucina-1 (IL-1Ra). (DHAR et al., 2000).

Tanto a IL-1 α quanto a IL-1 β , são produzidas como grandes proteínas precursoras, enquanto que a IL-1 α permanece no citoplasma ou se apresenta na forma ligada a membrana sendo liberada principalmente quando o organismo está passando por doenças graves, por sua vez a IL-1 β é secretada na circulação (THORNBERRY et al., 1992). A IL-1 β apresenta um precursor, a pro-IL-1 β de 31 kDa que é induzida por ativação da via do NF- κ B em resposta aos estímulos de PAMPs. É localizada no citosol em sua forma biologicamente inativa. A forma ativa da IL-1 β de 17,5 kDa é clivada por caspase-1, que é liberada a partir do inflamassoma em resposta aos outros estímulos de PAMPs (THORNBERRY et al., 1992; LOPEZ-CASTEJON; BROUGH, 2011).

A síntese, o processamento e a secreção de IL-1, particularmente IL-1 β , são fortemente reguladas (KANNEGANTI et al., 2006). IL-1 afeta quase todas as células, quer isoladamente ou em uma forma sinérgica com outros mediadores. IL-1 β é primeiramente uma citocina pró-inflamatória para estimular a expressão de genes associados com inflamação e doenças auto-imunes (DINARELLO, 1996; CONTASSOT et al., 2012).

As principais células produtoras de IL-1 β são os monócitos e macrófagos, mas também são produzidas por células T, células NK, células endoteliais, astrócitos, fibroblastos, células da microglia, células corticais supra-renais e células β do pâncreas (DINARELLO, 1996; WEWERS et al., 1997; HEITMEIER et al., 2001; AGGELAKIS et al., 2010). É uma citocina pleiotrópica envolvida em respostas do hospedeiro à invasão microbiana, inflamação, regulação imune, reações metabólicas, processos hematopoiéticos e progressão do tumor (OBERHOLZER et al., 2000).

Uma série de atividades inflamatórias e imunomoduladoras são desempenhadas por IL-1 β (CAMARGO et al., 2004). Aumento da expressão de moléculas de adesão, estimulação da produção de outras citocinas e mediadores inflamatórios de uma maneira autócrina e parácrina,

induz ciclooxigenase tipo 2, e afeta o reconhecimento do antígeno e função dos linfócitos, proliferação de células B, crescimento de fibroblastos, atua como inibidor do crescimento e efeito citocida em várias linhagens de células (GRAMANTIERI et al., 1999; DINARELLO, 2009). Além disso, a IL-1 β também podem desencadear oligodendrócitos e degeneração neuronal provocada por um excesso de sinalização excitatória de glutamato e a regulação negativa da transmissão inibitória GABAérgica (TAKAHASHI et al., 2003; GALIC et al., 2012).

Recentemente, o líquido cefalorraquidiano contendo IL-1 β de pacientes com EM ativa foi relacionado com o aumento espontâneo da frequência da corrente pós-sináptica excitatória mediada por glutamato e mediando o inchaço de neurônios *in vitro*, sugerindo uma possível ligação entre inflamação e neurodegeneração excitotóxica na EM (ROSSI et al., 2012).

A descoberta de substâncias produzidas por macrófagos e linfócitos que podem induzir necrose hemorrágica de tumores transplantados em camundongos, estas citocinas foram isoladas recebendo o nome de fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e linfotoxina- α (LT- α , também conhecida como TNF- β) (LIM; CONSTANTINESCU, 2010). As células que secretam ou expressam TNF na membrana são predominantemente macrófagos e monócitos e em menor escala linfócitos B e T, células NK (do inglês: Natural Killer), astrócitos, micróglia, fibroblastos, adipócitos (LIM; CONSTANTINESCU, 2010).

O TNF- α existe em duas formas, ligado a membrana das células e solúvel. A forma ligada a membrana se apresenta como uma pró-proteína trimérica, biologicamente ativa com um peso de 26 kDa, e a forma solúvel (sTNFR) de 17 kDa é liberada das células após a clivagem enzimática do seu precursor ligado à membrana, a enzima responsável por esse processo é a TNF-alpha-*converting enzyme* (TACE) (LIM; CONSTANTINESCU, 2010).

As atividades de TNF- α são mediadas através da ligação de suas formas solúvel e ligada a membrana, por receptores específicos, que pertencem a uma superfamília de receptores TNF. Esta citocina pode se ligar com uma afinidade variável a dois subtipos de receptores (TNF), que são TNF-R1 (p55TNFR), constitutivamente expresso em todas as células com exceção dos eritrócitos, e o TNF-R2 (p75TNF), que é geralmente induzido e expresso em células endoteliais e em células hematopoiéticas. Foi observado que a forma de TNF- α solúvel liga-se preferencialmente ao TNF-R1, sendo considerado o principal receptor através do qual a maioria dos efeitos inflamatórios de TNF- α são exercidos, em contrapartida a forma associada à membrana interage com o receptor TNF-R2 (LIM; CONSTANTINESCU, 2010).

Os TNFR ativam genes inflamatórios, controlando a proliferação e morte celular, podendo ser postulado, de maneira geral, que o TNFR1 está associado com funções citotóxicas e pró-inflamatórias, causando injúria tecidual, enquanto o TNFR2 promove a ativação, migração e proliferação celular, atuando no reparo tecidual e angiogênese (AGGARWAL 2003; BRADLEY 2008).

Para a manutenção dos níveis adequados de TNF- α circulante, a sua sinalização e expressão precisam ser fortemente regulados a nível transcricional e pós-transcricional. A transcrição do gene TNF- α é iniciada após a exposição a uma variedade de estímulos extracelulares incluindo, lipopolissacarídeos, vírus, células tumorais, sistema do complemento e citocinas, como (IFN- γ) (GOLDFELD et al., 1990; FALVO et al., 2000).

Sua regulação ocorre pela presença de corticosteróides, prostaglandinas e IL-10 que realizam a regulação negativa (MOLDAWER, 2003). Os dois receptores de TNF que são liberados da membrana após sofrerem clivagem proteolítica, podem ligar-se a TNF- α , agindo como um antagonista natural (ADERKAD et al., 1992).

Em particular, TNF- α demonstrou promover a inflamação, mediar o crescimento e diferenciação celular e induzir a apoptose em uma variedade de tipos de células, incluindo as células tumorais, células-T, células virais, oligodendrócitos, células endoteliais e células epiteliais do hospedeiro (LIM; CONSTANTINESCU, 2010).

Os níveis de TNF- α mostraram-se elevados em uma variedade de outras alterações do SNC, tais como, esclerose múltipla, isquemia cerebral, lesão cerebral traumática, doença de Parkinson e doença de Alzheimer (LIM; CONSTANTINESCU, 2010).

A lesão no SNC ocorre através da secreção de citocinas pró-inflamatória, incluindo o TNF- α de células T autorreativas, microglia e astrócitos, e por anticorpos específicos da mielina/oligodendrócitos via citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ANTEL, 2006; LASSMANN et al., 2007).

Além de causar danos diretos em oligodendrócitos, foi mostrado que TNF- α atua de forma indireta danificando oligodendrócitos e neurônios através da modulação da acumulação e liberação de glutamato em astrócitos (KORN et al., 2005). TNF pode potencializar a excitotoxicidade do glutamato diretamente através da ativação de receptores de glutamato NMDA e localização de receptores de AMPA para as sinapses, e indiretamente pela inibição dos transportadores de glutamato gliais em astrócitos (MACCOY; TANSEY, 2008).

A excitotoxicidade do glutamato é reconhecida como um mecanismo de lesão axônios e em oligodendrócitos nos modelos de esclerose múltipla. O antagonismo dos receptores de

glutamato (por exemplo, receptores tipo NMDA, AMPA e cainato) podem proteger as estruturas neuronais de danos excitotóxico, reduzir potencialmente a progressão da doença e reverter dano axonal na EM (PITT et al., 2000; BASSO et al., 2008).

Mais recentemente, foi demonstrada a capacidade de TNF- α em estimular a expressão de moléculas de adesão celular, tais como a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e molécula de adesão das células vasculares 1 (VCAM-1), sobre células vasculares endotelial e que a sinalização TNF- α através do TNF-RI é necessária para a expressão de VCAM-1 em astrócitos, que por sua vez é essencial para a transmigração das células T autorreativas para dentro do parênquima do SNC no modelo de EAE passivamente transferidos. Esses estudos apoiam ainda mais o papel das TNF-a em várias fases do processo inflamatório na EM (GIMENEZ et al., 2004).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar resposta imunológica inicial no modelo de Encefalomielite Autoimune Experimental

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliação do Escore Clínico e Massa Corporal dos animais com EAE por 17 dias após a imunização;
- Avaliar os níveis da citocina TNF- α e IL-1 β em homogenato de linfonodos inguinais e medula espinhal nos dias 2, 4 e 7 após a imunização.
- Avaliar do número de células MHCII⁺F4/80⁺CD11c⁺ e células B MHCII⁺CD19⁺ expressando TLR nos linfonodos inguinais;
- Avaliar o número de células MHCII⁺F4/80⁺CD11c⁺ e células B MHCII⁺CD19⁺ expressando TLR na medula espinhal;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

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

3.2 Delineamento Experimental

Os animais foram imunizados por via subcutânea (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 intraperitoneal (i.p.). Os camundongos foram divididos em três grupos experimentais avaliados em três pontos distintos 2, 4 e 7 dias pós-imunização (Tabela 1): **Grupo controle:** não imunizado; **grupo MOG negativo (MOG -):** imunizado com CFA + *M. tuberculosis* - 4mg/mL + toxina pertussis - 300ng/animal e **grupo MOG positivo (MOG +):** imunizado com 100µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ + CFA + *M. tuberculosis* - 4mg/mL + toxina pertussis - 300ng/animal.

Tabela 1: Distribuição dos animais em grupos.

Grupos/ Dias avaliados	Análises realizadas (n° de animais utilizados)		
	Controles	MOG -	MOG +
2° dia pós-imunização	Citocinas (n=9)	Citocinas (n=9)	Citocinas (n=9)
4° dia pós-imunização	Citocinas (n=9)	Citocinas (n=9)	Citocinas (n=9)
	Citometria (n=10)	Citometria (n=10)	Citometria (n=10)
7° dia pós-imunização	Citocinas (n=9)	Citocinas (n=9)	Citocinas (n=9)
17° dia pós-imunização	Acompanhamento de peso e escore clínico (n=7)	Acompanhamento de peso e escore clínico (n=7)	Acompanhamento de peso e escore clínico (n=7)

3.3 Avaliação do Escore Clínico e Massa Corporal

Vinte e um animais foram divididos entre os três grupos experimentais (7 animais/grupo) e tiveram seu escore clínico e massa corporal avaliados. A massa corporal dos animais foi determinada no dia zero e em todos os dias pós-imunização, até o 17° dia pós-imunização (d.p.i.). A avaliação do escore clínico foi realizada do 2° até o 17° d.p.i., sendo que os animais foram clinicamente avaliados e classificados com relação à incapacidade neurológica através da escala apresentada na tabela 2, adaptada por De PAULA e colaboradores (2008). O escore final de cada animal corresponde ao somatório da pontuação obtida em todos os parâmetros avaliados em um mesmo dia.

Tabela 2: Escala neurológica clínica de avaliação da EAE.

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

Fonte: Adaptada: De PAULA et al., 2008.

3.4 Eutanásia dos animais e obtenção dos órgãos e células

Foram realizados experimentos independentes, um para análise e quantificação de citocinas por 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) nos dias 2, 4 e 7 pós-imunização. Após estarem completamente anestesiados, parte dos animais, foram perfundidos intracardialmente no ventrículo esquerdo com tampão salina fosfato (PBS) para a retirada de medula espinhal e linfonodos inguinais para a quantificação de citocinas por ELISA, os tecidos retirados foram rapidamente armazenados em freezer -70°C .

Em outro experimento medula espinhal e linfonodos inguinais destinados a citometria de fluxo foram coletados e imediatamente processados para separação das células mononucleares do cérebro, medula espinhal e linfonodos inguinais e estas foram submetidas aos protocolos de marcação extracelular e intracelular.

3.5 Quantificação de citocinas por ELISA

Homogenatos dos linfonodos inguinais e medula espinhal foram submetidos à técnica de ELISA para a determinação dos níveis de citocinas (TNF- α , IL-1 β). As placas de ELISA foram sensibilizadas com o anticorpo de captura, diluído em tampão específico e incubadas por 18 h a 4°C. Em seguida, lavadas quatro vezes com PBS-Tween e bloqueadas com PBS + Soro Fetal Bovino (10%) por 1 hora. Após este período, as placas foram lavadas novamente quatro vezes e, em seguida, as amostras dos animais utilizados e os padrões de citocinas foi adicionado. As placas foram então incubadas por 18 horas a 4°C. Após a incubação, as placas foram lavadas quatro vezes, o 2º anticorpo biotinilado e o complexo enzimático 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 foram calculadas a partir das curvas-padrão, obtidas pelas diferentes concentrações dos respectivos recombinantes TNF- α , IL1- β (BD Biosciences Pharmigen, San Diego, CA, USA).

3.6 Isolamento e preparação de células mononucleares dos linfonodos inguinais e medula espinhal

Os linfonodos inguinais e medula espinhal foram coletados para realização da citometria de fluxo e 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 dos linfonodos inguinais e 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 foram separadas por gradiente de Percoll e submetidos a uma lavagem com solução de PBS, 1% SFB e 0,09% de azida sódica, conforme descrito por Blacon e colaboradores (2008). A seguir as células foram lavadas em solução de ACK, centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos e resuspensas em PBS, 1% SFB e 0,09% de azida sódica.

3.7 Avaliação de marcadores celulares por Citometria de Fluxo

Células isoladas dos linfonodos inguinais e medula espinhal foram incubadas com anticorpos anti-mouse F4/80 (PerCP), anti-mouse CD11b-PE (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA), anti-mouse TLR-4-ficoeritrina (PE), anti-mouse MHC classeII I-AD- alofococianina (APC) (eBioscience, San Diego, USA), anti-mouse 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 anti-mouse TLR-3-PE e anti-mouse TLR-9-PE (IMGENEX, San Diego, USA). A captura das células foi feita utilizando-se o citômetro de fluxo FACS Calibur e as análises realizadas com *FCS express version 3*.

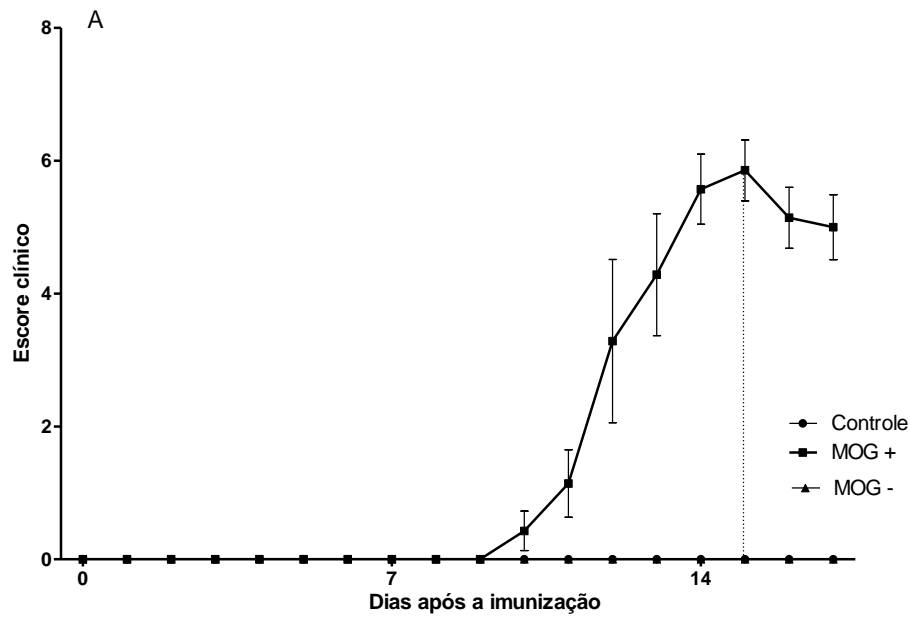
3.8 Análise Estatística

Os resultados apresentados nos testes são provenientes de dois experimentos independentes. Todos os dados foram analisados por teste de Mann Whitney (GraphPad Prism 5.00), e as diferenças foram consideradas para valores de $p < 0.05$.

4 RESULTADOS

4.1 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-imunização. 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 MOG + desenvolveram sinais clínicos, sendo o dia 10 após indução, o início dos sinais clínicos da doença, nestes animais. O pico máximo de pontuação clínica ocorreu no 15º dia pós-imunização e a média da pontuação do escore clínico durante o pico foi 5.86 ± 0.56 (Figura 2 A). Em paralelo ao agravamento dos sinais clínicos da EAE foi observada perda acentuada da massa corporal nos animais do grupo MOG + quando comparados aos animais do grupo controle não imunizado entre os dias 12 e 17 pós-imunização ($p < 0,05$) (Figura 2B).



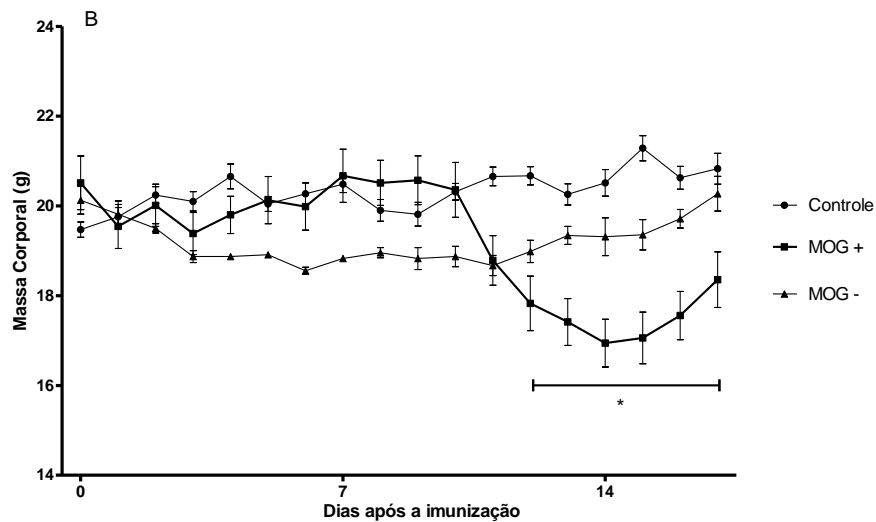


Figura 4 Média do escore clínico e massa corporal. Escore clínico (A) e Massa corporal (B) de camundongos C57BL/6 imunizados com CFA + *M. tuberculosis* (grupo MOG -), imunizados com 100µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ + CFA + *M. tuberculosis* (grupo MOG +), ou não imunizados (grupo controle) (n=7 por grupo). Os sinais clínicos e a massa corporal foram registrados do dia 0 até o 17º dia após a imunização. Cada ponto representa a média±erro padrão. * = p<0,05 versus o grupo controle não imunizado.

4.2 Concentração das citocinas TNF- α e IL1- β em homogenato de linfonodos inguinais e medula espinhal

Nos linfonodos inguinais o TNF- α apresentou-se elevado no grupo MOG - no 2º, 4º e 7º dpi e no grupo MOG + 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 MOG +. O grupo MOG + também apresentou níveis de TNF- α maiores no 7º dpi em relação ao 2º e 4º dpi (Figura 3A).

Nos linfonodos inguinais a concentração de IL-1 β nos grupos MOG - e MOG + foram maiores no 2º, 4º e 7º dpi em relação ao grupo controle não imunizado. Além disso, no grupo MOG + os níveis de IL-1 β foram maiores no 4º e 7º dpi em relação ao 2º dpi (Figura 3B).

Na medula espinhal o TNF- α estava elevado no grupo MOG + 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 MOG + em relação ao 7º dpi do grupo MOG -. Além disso, no grupo MOG + a concentração de TNF- α foi mais elevada no 7º dpi em relação ao 2º e 4º dpi (Figura 3 C).

A citocina IL-1 β estava elevada no grupo MOG - no 2º, 4º e 7º dpi e no grupo MOG + nos 4º e 7º dpi em relação ao grupo controle não imunizado na medula espinhal. Os níveis de IL-1 β também estavam elevados nos 4º e 7º dpi do grupo MOG + em relação ao 4º e 7º dpi do

grupo MOG -. Além disso, no grupo MOG + os níveis de IL-1 β foram maiores no 4 $^{\circ}$ e 7 $^{\circ}$ dpi em relação ao 2 $^{\circ}$ (Figura 3 D).

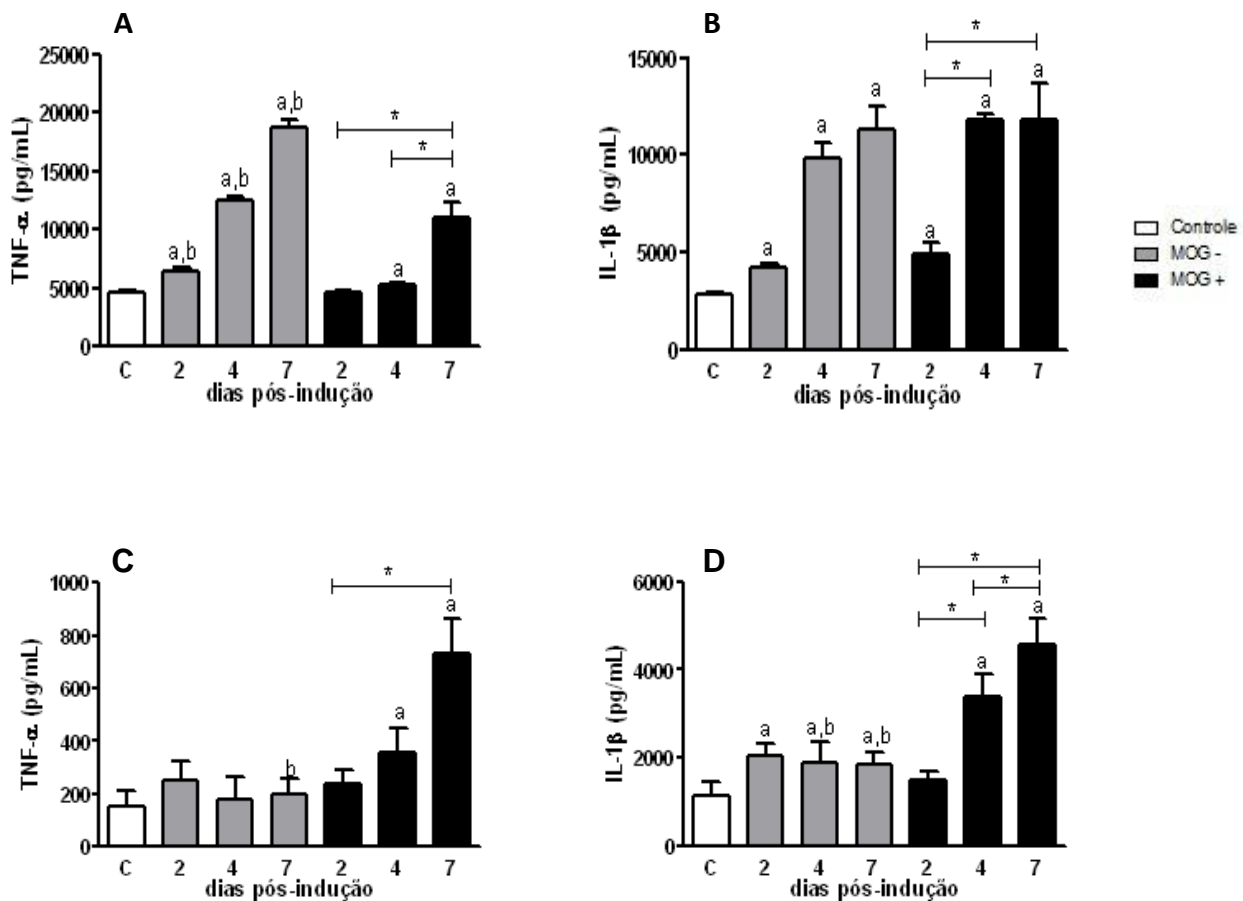


Figura 5 Concentração das citocinas do TNF- α (A) e IL-1 β (B) no homogenato de linfonodos inguinais e TNF- α (C) e IL-1 β (D) no homogenato de medula espinal de C57BL/6 imunizados com CFA + *M. tuberculosis* (grupo MOG -), imunizados com 100 μ g do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ + CFA + *M. tuberculosis* (grupo MOG +), ou não imunizados (grupo controle) (n=9 animais por grupo), avaliadas por ELISA, nos dias 2, 4 e 7 pós-imunização. a = p<0,05 versus o grupo controle; b = p<0,05 quando comparado ao mesmo dia do grupo MOG +; * = p<0,05 entre os dados comparados.

4.3 Células MHCII⁺F4/80⁺CD11c⁺ E células B MHCII⁺CD19⁺ expressando TLR nos linfonodos inguinais

Os grupos MOG - e MOG + apresentaram maior número de células MHCII⁺F4/80⁺CD11c⁺ isoladas dos linfonodos inguinais expressando TLR4 (Figura 4B) na sua superfície em relação ao controle não imunizado. Não ocorreu diferença significativa entre os

grupos MOG- e MOG+ e em relação ao controle não imunizado no número de células MHCII⁺F4/80⁺ CD11c⁺ expressando TLR3 e TLR9 (Figuras 4A e 4C).

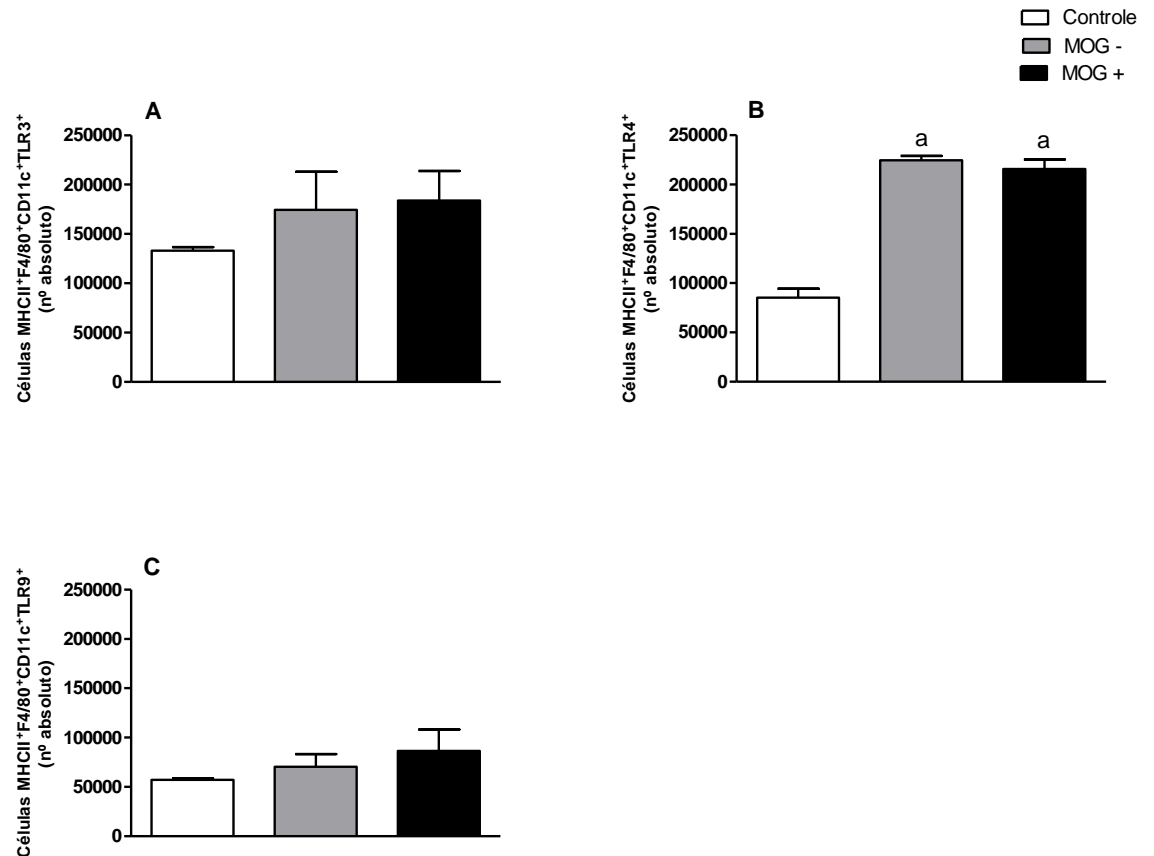


Figura 6 Número de células MHCII⁺F4/80⁺CD11c⁺ expressando TLR3(A), TLR4(B) e TLR9(C) determinada por citometria de fluxo de células mononucleares isoladas dos linfonodos inguinais de camundongos C57BL/6 imunizados com CFA + *M. tuberculosis* (grupo MOG -), imunizados com 100µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ +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

Ocorreu diferença significativa entre os grupos MOG - e MOG + e em relação ao controle não imunizado no número de células B MHCII⁺CD19⁺ expressando TLR3, TLR4 e TLR9 (Figura 5A, 5B, 5C).

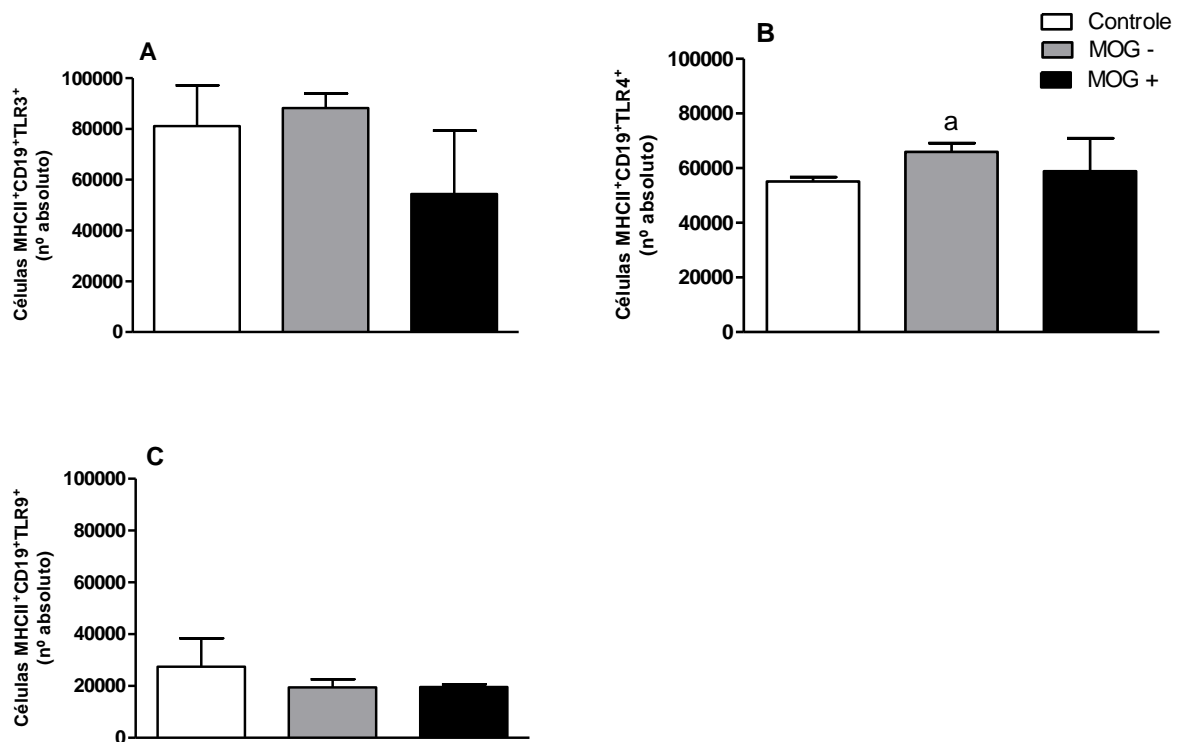


Figura 7 Número de células MHCII⁺CD19⁺ expressando TLR3(A), TLR4(B) e TLR9(C) determinada por citometria de fluxo de células mononucleares isoladas dos linfonodos inguinais de camundongos C57BL/6 imunizados com CFA + *M. tuberculosis* (grupo MOG -), imunizados com 100µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ + CFA + *M. tuberculosis* (grupo MOG +), ou não imunizados (grupo controle) (n=10 animais por grupo), no dia 4 pós-imunização. a = p<0,05 versus o grupo controle; * = p<0,05 entre os dados comparados.

4.4 Avaliação do número de células MHCII⁺F4/80⁺CD11c⁺ e células B MHCII⁺CD19⁺ expressando TLR na medula espinhal

O grupo MOG + apresentou maior número de células MHCII⁺F4/80⁺CD11c⁺ e células B MHCII⁺CD19⁺ isoladas da medula espinhal expressando TLR3, TLR4 e TLR9 na sua superfície em relação ao grupo MOG - e ao controle não imunizado (Figuras 6A, 6B, 6C, 7A, 7B e 7C).

Foi maior o número de MHCII⁺F4/80⁺CD11c⁺ expressando TLR9 na sua superfície, no grupo MOG +, quando comparadas com as células B MHCII⁺CD19⁺, no mesmo grupo (Figuras 6C e 7C).

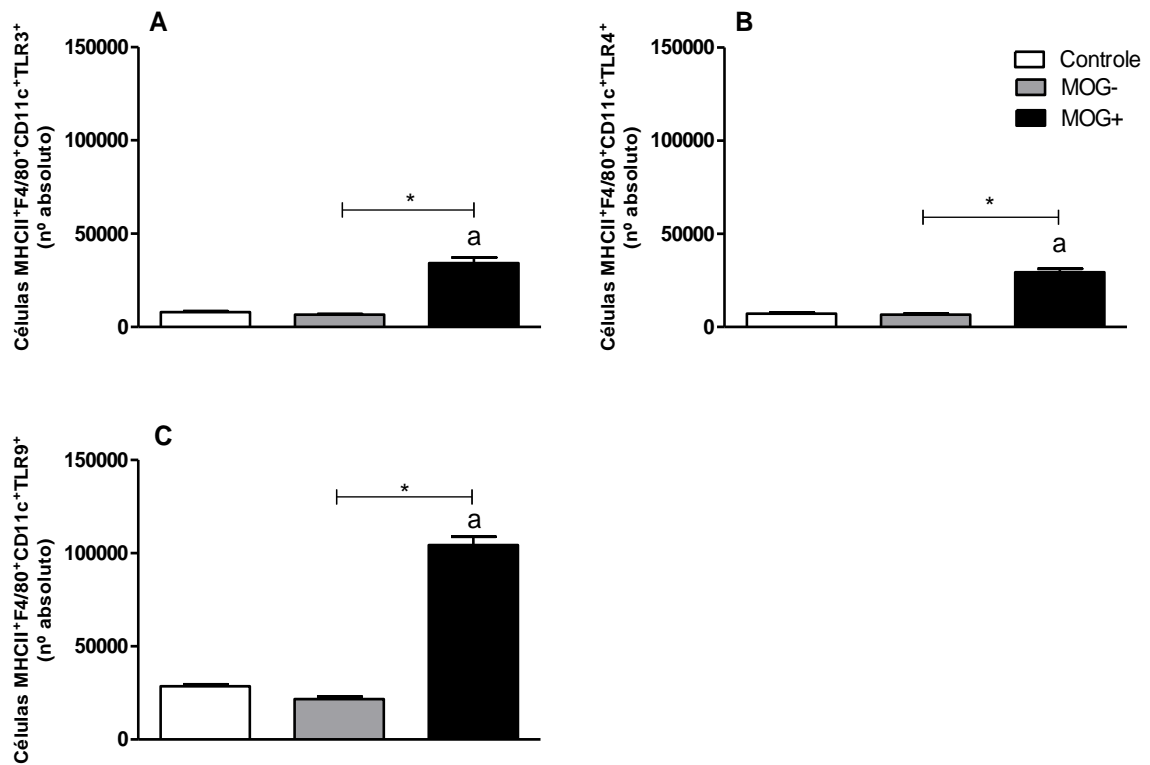


Figura 8 Número de células MHCII⁺F4/80⁺CD11c⁺ expressando TLR3(A), TLR4(B) e TLR9(C) determinada por citometria de fluxo de células mononucleares isoladas da medula espinal de camundongos C57BL/6 imunizados com CFA + *M. tuberculosis* (grupo MOG -), imunizados com 100µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ + CFA + *M. tuberculosis* (grupo MOG +), ou não imunizados (grupo controle) (n=10 animais por grupo), no dia 4 pós-imunização. a = p<0,05 versus o grupo controle; * = p<0,05 entre os dados comparados.

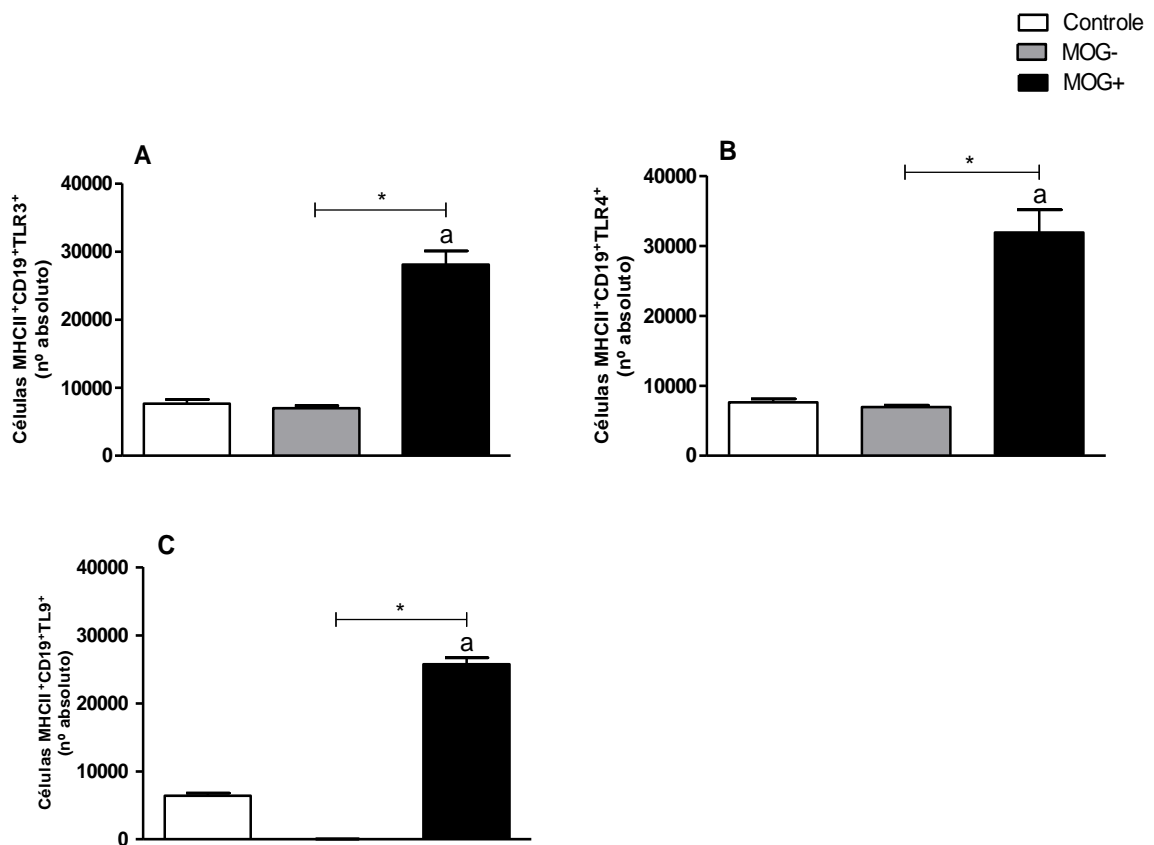


Figura 9 Número de células MHCII⁺CD19⁺ expressando TLR3(A), TLR4(B) e TLR9(C) determinada por citometria de fluxo de células mononucleares isoladas da medula espinhal de camundongos C57BL/6 imunizados com CFA + *M. tuberculosis* (grupo MOG -), imunizados com 100µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ + CFA + *M. tuberculosis* (grupo MOG +), ou não imunizados (grupo controle) (n=10 animais por grupo), no dia 4 pós-imunização. a = p<0,05 versus o grupo controle; * = p<0,05 entre os dados comparados.

5. DISCUSSÃO

A EAE é o modelo animal de doença desmielinizante mais utilizado para o estudo da EM (DENIC et al., 2011). É caracterizada pela resposta imune mediada predominantemente por células T CD4 contra as proteínas da mielina, induzida, portanto, pela administração concomitante dos antígenos da mielina com CFA ou por transferência adotiva de células T reativas contra antígenos da mielina (STROMNES; GOVERMAN, 2006).

A presença do CFA é importante na indução do modelo de EAE, pelo fato de que a EM pode ocorrer após infecções, principalmente virais. O sistema imune inato periférico passa então a desempenhar papel importante durante as patologias inflamatórias do SNC, uma vez que os PAMPs podem ser desencadeadores de uma resposta autoimune, conforme a existência de pré-disposição genética (KARNI et al., 2006).

No presente estudo foram avaliadas as alterações imunológicas na fase inicial do modelo da EAE utilizado para estudo da Esclerose Múltipla (SOSPEDRA; MARTIN, 2005; HEDEGAARD et al., 2008). A EAE é um modelo já bem estabelecido que possui variações nas formas de indução, mas que convergem para a instalação de um processo inflamatório e desmielinizante do Sistema Nervoso Central em função da utilização de proteínas derivadas da mielina (AHARONI et al., 2011; SIMMONS et al., 2013)

Ao compararmos os grupos que receberam todos componentes da indução (MOG +) e o grupo que recebeu apenas os adjuvantes (MOG -) com o grupo não imunizado (grupo controle) foi possível observar inicialmente uma resposta periférica caracterizada pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias, tais como, IL1- β e TNF- α no 2º, 4º ou 7º dia após a imunização nos grupos MOG + e MOG - em relação ao grupo não imunizado o que pode sugerir o preparo do sistema imune periférico mediante os estímulos recebidos com os adjuvantes (grupo MOG -) e ou adjuvantes associados ao antígeno específico MOG₃₅₋₅₅ (grupo MOG +). Estudos mostram que o aumento do TNF- α na periferia está envolvido com a entrada posterior de células T reativas a mielina no SNC (YANG et al., 2013).

O aumento de TNF- α no SNC ocorre apenas no grupo MOG +, enquanto que no grupo MOG - este aumento é observado somente na periferia, sugerindo uma possível migração de células inflamatórias para o SNC no caso do grupo MOG + o que provavelmente não ocorreu no grupo MOG -. A produção de TNF- α observada no tecido nervoso estudado sugere a participação em manter uma resposta inflamatória.

No presente estudo ocorreu um aumento de IL-1 β no grupo MOG - e no grupo MOG + nos linfonodos, este aumento também foi verificado na medula espinhal só que neste caso apenas para o grupo MOG +, o que novamente sugere que a presença de MOG é fundamental para a migração de células para o SNC e está relacionada a produção de citocinas inflamatórias no início da doença. Estes resultados estão de acordo com estudos realizados por Cannella e Raine (1995), foi visto uma elevação dos níveis de IL-1 β no líquido cefalorraquidiano e soro de pacientes com EM. Este aumento dos níveis de IL-1 β também foram vistos em lesões cerebrais de pacientes com EM (CANNELLA; RAINE, 1995).

De acordo com Filion e colaboradores (2003), os macrófagos secretam níveis significativos de citocinas pró-inflamatórias, especificamente IL-1 β , IL-6 e TNF- α , em pacientes com esclerose múltipla em comparação com indivíduos saudáveis.

Estudos com camundongos deficientes em receptor de IL-1 (IL-1R) possuem uma atenuação dos sinais clínicos da EAE, redução na expressão de moléculas de adesão e na entrada de células para a medula (SCHIFFENBAUER et al., 2000; LI et al., 2011).

Nos linfonodos inguinais a ativação periféricas de células MHCII+F4/80+CD11c+ que expressam TLR3 e TLR9 foi independente da presença do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, pois não ocorreram diferenças significativas entre os grupos MOG - e MOG + e em relação ao controle não imunizado. Entretanto os grupos MOG - e MOG + apresentaram um número significativo de células MHCII+F4/80+CD11c+ expressando TLR4 quando comparados ao controle não imunizado. Evenold et al (2010), constataram que o TLR4 tem sua expressão aumentada nas células mononucleares do LCR de doentes com EM em comparação aos controles saudáveis. Adicionalmente, acredita-se que o Mycobacterium tuberculosis presente no CFA potencializa a ativação uma variedade de TLR, incluindo TLR1, TLR2 e TLR4 (HANSEN et al., 2006). Essa ligação ao TLR4 induz a produção de IL-1, IL-6 e IL-12, que induz a diferenciação de células T naive em células Th1 e Th17. Células Th17 e Th1 secretam IL-17 e INF- γ , respectivamente a produção celular de IL-17/INF- γ facilita a migração de leucócitos através da barreira hematoencefálica e contribui para o dano no SNC. IL1 e IL6 também inibem a diferenciação em células T reguladoras (ENEVOLD et al., 2010).

O papel das células B no modelo de EAE tem sido frequentemente discutido durante vários anos. As células B tem sido relacionadas com a apresentação e produção de anticorpos autoreativos (LITZENBURGER et al., 1998).

Neste estudo o número de células B MHCII⁺ CD19⁺ foi avaliado nos linfonodos inguinais, ocorrendo diferença significativa entre os grupos MOG +, MOG - e em relação ao controle não imunizado no número de células B MHCII⁺ CD19⁺ expressando TLR3, TLR4 e

TLR9. Apesar de na esclerose múltipla, ocorrer ativação e migração células B para o SNC que medeiam a destruição de mielina, dano axonal e morte de células neuronais (WALDNER et al., 2004). Conclui-se que as células B não são críticas para os as etapas iniciais que levam ao processo de inflamação do SNC induzida por MOG₃₅₋₅₅.

No presente estudo foi constatado que na medula espinhal o grupo MOG + foi o que apresentou um relevante número de células MHCII⁺F4/80⁺CD11c⁺ e células B MHCII⁺ CD19⁺, expressando TLR3, TLR4 e TLR9 em comparação ao grupo MOG - e ao controle, levando a uma manutenção de uma resposta imune encefalitogênica dentro do SNC.

Estas células infiltrantes, principalmente células T, células B e macrófagos são capazes de amplificar a resposta inflamatória, com a ativação de células residentes, como astrócitos e microglia, levando a destruição da bainha de mielina ou pela morte dos oligodendrócitos, dano ou perda dos axônios, gliose, que se caracteriza por aumento do número de células da glia na substância branca (CONSTANTINESCU et al., 2011).

Kerfoot et al., mostraram que a toxina pertussis, que é comumente co-administrada durante protocolos de imunização para EAE, induziu a expressão de P-selectina, aumentou interações entre leucócitos e células endoteliais, e facilitou a infiltração de leucócitos no SNC. A sinalização mediada pela toxina pertussis e o extravasamento de leucócitos para o SNC foram principalmente associados ao TLR4, uma vez que estes efeitos não foram observados nos camundongos knockout para TLR4. (KERFOOT et al., 2004).

Portanto neste trabalho foi observado a eficiência do modelo de indução de EAE por emulsão contendo o peptídeo MOG₃₅₋₅₅, mostrou eficaz na ativação dos TLR3, TLR4 e TLR9 através da quebra da tolerância periférica e indução de uma resposta patogênica contra o SNC.

6. CONCLUSÃO

No presente trabalho foi possível relacionar a presença TNF- α , IL-1 β e TLRs, com o desenvolvimento da EAE, e mostrar as alterações da resposta imunológica mediante a presença do peptídeo da mielina.

Foi visto inicialmente que todos os animais do grupo MOG + desenvolveram sinais clínicos, sendo o dia 10 após indução, o início dos sinais clínicos da doença, nestes animais. Em paralelo foi observada perda acentuada da massa corporal nos animais do grupo MOG + quando comparados aos animais do grupo controle não imunizado entre os dias 12 e 17 pós-imunização.

Nos linfonodos a resposta foi caracterizada pelo aumento de IL1- β e TNF- α no 2 $^{\circ}$, 4 $^{\circ}$ ou 7 $^{\circ}$ dia após a imunização nos grupos MOG + e MOG - em relação ao grupo não imunizado.

Na medula espinhal ocorreu aumento de TNF- α apenas no grupo MOG +, enquanto que no grupo MOG - este aumento é observado somente na periferia. Foi observado um aumento de IL1- β na medula espinhal para o grupo MOG +.

Nos linfonodos inguinais a ativação de células MHCII+F4/80+CD11c+ que expressam TLR3 e TLR9 foi independente da presença do peptídeo MOG35-55. Entretanto os grupos MOG - e MOG + apresentaram um número significativo de células MHCII+F4/80+CD11c+ expressando TLR4 quando comparados ao controle não imunizado

O número de células B MHCII+ CD19+ nos linfonodos inguinais, apresentou diferença significativa entre os grupos MOG +, MOG - e em relação ao controle não imunizado expressando TLR3, TLR4 e TLR9.

Foi constatado que na medula espinhal o grupo MOG + foi o que apresentou um relevante número de células MHCII+F4/80+CD11c+ e células B MHCII+ CD19+, expressando TLR3, TLR4 e TLR9 em comparação ao grupo MOG - e ao controle, levando a uma manutenção de uma resposta imune encefalitogênica dentro do SNC.

Entretanto, mais estudos precisam ser desenvolvidos para a compreensão dos mecanismos imunológicos envolvidos na fase inicial da doença, pois o esclarecimento destes mecanismos poderia proporcionar o desenvolvimento de terapias mais eficazes para o tratamento de esclerose múltipla.

Dado o impacto dos eventos desencadeados pela ligação de TNF- α e IL-1 β , a seus receptores, o desenvolvimento de um eficiente inibidor dos receptores de TNF- α e IL-1 β para utilização clínica é de grande importância.

A expressão de uma variedade de TLRs é elevada no SNC de camundongos EAE. O tratamento com ligantes reguladores de TLRs que modulem especificamente vias de sinalização TLR podem ser eficazes no tratamento da EAE e EM.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e molecular**.7. ed. Elsevier Editora Ltda. 2012.
- ADERKA, D.; ENGELMANN, H.; MAOR, Y.; et al. Stabilization of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptors. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 175, n. 2, p. 9-323, 1992.
- AGGARWAL, B.B. Signalling pathways of the TNF superfamily a double-edged sword. **Nature Reviews**, v. 3, p. 745-755, 2003.
- AGGELAKIS, K.; ZACHARAKI, F.; DARDIOTIS, E.; XIROMERISIOU, G.; TSIMOURTOU, V.; RALLI, S, et al. Interleukin-1B and interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms in Greek multiple sclerosis (MS) patients with bout-onset MS. **The Journal of Neurological Sciences**, v. 31, n. 3, p. 7-253, 2010.
- AHARONI, R.; VAINSHTEIN, A.; STOCK, A.; et al. Distinct pathological patterns in relapsing-remitting and chronic models of experimental autoimmune encephalomyelitis and the neuroprotective effect of glatiramer acetate. **The Journal of Autoimmunity**, v. 37, p. 41-228, 2011.
- ANDJELKOVIC, A.V.; KERKOVICH, D.; SHANLEY, J.; PULLIAM, L.; PACHTER, J.S. Visualization of Chemokine Binding Sites on Human Brain Microvessels **Glia**, **The Journal of Cell Biology**, v. 28, n. 3, p. 225-235, 1999.
- ANTEL, J. Oligodendrocyte/myelin injury and repair as a function of the central nervous system environment. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, v. 108, n. 3, p. 9-245, 2006.
- ASCHERIO, A.; MUNGER, K.L. Environmental Risk Factors for Multiple Sclerosis. Part I: The Role of Infection. **Annals of Neurology**, v. 61, n. 4, p. 9-288, 2007.
- ASCHERIO, A.; MUNGER, K.L.; SIMON, C. Vitamin D and Multiple Sclerosis. **Lancet Neurology**, v. 9, p. 599-612, 2010.
- BANISOR, I.; LEIST, T.P.; KALMAN, B. Involvement of β -chemokines in the development of inflammatory demyelination. **Journal Neuroinflammation**, v. 2, p. 1-14, 2005.
- BASSO, A.S, FRENKEL, D.; QUINTANA, F.J.; et al. Reversal of axonal loss and disability in a mouse model of progressive multiple sclerosis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 4, p. 43-1532, 2008.
- BERNARD, C.C.; JOHN, T.G.; SLAVIN, A.; ICHIKAWA, M.; EWING, C.; LIU, J.; et al. Myelin oligodendrocyte glycoprotein: a novel candidate autoantigen in multiple sclerosis. **Jornal of Molecular Medicine**, v. 75, n. 2, p. 77-88, 1997.
- BETTELLI, E.; SULLIVAN, B.; SZABO, S.J.; SOBEL, R.A.; GLIMCHER, L.H.; KUCHROO, V.K.. Loss of T-bet, but not STAT1, prevents the development of experimental

autoimmune encephalomyelitis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 200, n. 1, p. 79-87, 2004.

BETTELLI, E; KUCHROO, V.K. IL-12 and IL-23-induced T helper cell subsets: birds of the same feather flock together. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 201, n. 2, p. 71-169, 2005.

BIBER, K.; ZUURMAN, M.W.; DIJKSTRA, I.M.; BODDKE, H. Chemokines in the brain: neuroimmunology and beyond. **Current Opinion in Pharmacology** v. 2, p. 63-68, 2002.

BORNSEN, L.; KHADEMI, M.; OLSSON, T.; SORENSEN, O.S.; SELLEBJERG, F. Osteopontin concentrations are increased in cerebrospinal fluid during attacks of multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis**, v. 17, n. 1, p. 32-42, 2011.

BRADL, M.; HOHLFELD, R. Molecular pathogenesis of neuroinflammation. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 74, p. 1364-1370, 2003.

BRADLEY, J. TNF-mediated inflammatory disease. **The Journal of Pathology**, v. 214, n. 2, p. 149-160, 2008.

BRUCK, W.; STADELMANN, C. The spectrum of multiple sclerosis: new lessons from pathology. **Current Opinion in Neurology**, v. 18, n. 3, p. 221-224, 2005.

BSIBSI, M.; RAVID, R.; GVERIC, D.; VAN NOORT, J. M. Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 61, n. 11, p. 102-1013, 2002.

BSIBSI, M.; PERSON-DEEN, C.; VERWER, R.W.; MEEUWSEN, S.; RAVIS, R.; VAN NOORT, J.M. Toll-like receptor 3 on adult human astrocytes triggers production of neuroprotective mediators. **Glia Journal**, v. 53, p. 688-695, 2006.

CALEGARO, D.; SATO, D. Esclerose múltipla no Brasil: aspectos epidemiológicos da esclerose múltipla no Brasil: comparativo com estudos internacionais. São Paulo: Novartis, 14p, 2011.

CAMARGO, J.F.; CORREA, P.A.; CASTIBLANCO, J.; ANAYA, J.M. Interleukin-1beta polymorphisms in Colombian patients with autoimmune rheumatic diseases. **Genes and Immunity**, v. 5, n. 8, p. 14-609, 2004.

CANNELLA, B.; RAINE, C.S. The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. **Annual Review of Neurology**, v. 37, n. 4, p. 35-424, 1995.

CONFAVREUX, C.; HUTCHINSON, M.; HOURS, M. Pregnancy related relapse reduction in multiple sclerosis. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 339, n. 5, p. 91-285, 1998.

CONTASSOT, E.; BEER, H.D.; FRENCH, L.E. Interleukin-1, inflammasomes, autoinflammation and the skin. **Swiss Medical Weekly**, v.142, p. 13-590, 2012.

- COOK, S.D.; ROHOWSKY-KOCHAN, C.; BANSIL, S. Evidence for multiple sclerosis as an infectious disease. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 161, p. 4-32, 1995.
- CORRAL, L.G.; KAPLAN, G. Immunomodulation by thalidomide and thalidomide analogues. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 58, p. 13-1107, 1999.
- COSSINS, J.A.; CLEMENTS, J.M.; FORD, J.; MILLER, K.M.; PIGOTT, R.; VOS, W.; et al. Enhanced expression of MMP-7 and MMP-9 in demyelinating multiple sclerosis lesions. **Acta Neuropathologica**, v. 94, n. 6, p. 8-590, 1997.
- COSTA, O.; DIVOUX, D.; ISCHENKO, A.; TRON, F.; FONTAINE, M. Optimization of an animal model of encephalomyelitis autoimmune experimental achieved with a multiple MOG₃₅₋₅₅ peptide in C57BL/6/J strain of mice. **Journal of Autoimmunity**, v. 20, n. 1, p. 51-61, 2003.
- CONSTANTINESCU, C.S.; FAROOQI N.; O'BRIEN, K.; GRAN, B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). **British Journal of Pharmacology**, v. 164, p. 1079-106, 2011.
- DINARELLO, C.A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. **Blood**, v. 87, n. 6, p. 147-2095, 1996.
- DINARELLO, C.A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. **Annu. Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 519-550, 2009.
- DHAR, A.K.; THOMPSON, M.S.; PARADIS, M.R.; ACIVAR-WARREN, A. Determination of the cDNA sequence and mRNA expression of interleukin-1 receptor antagonist in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 61, n. 8, p. 920-924, 2000.
- DUJMOVIC, I.; MANGANO, K.; PEKMEZOVIC, T.; QUATTROCCHI, C.; MESAROS, S.; STOJSAVLJEVIC, N.; et al. The analysis of IL-1 beta and its naturally occurring inhibitors in multiple sclerosis: the elevation of IL-1 receptor antagonist and IL-1 receptor type II after steroid therapy. **Journal of Neuroimmunology**, v. 207, p. 6-101, 2009.
- DYMENT, D.A.; EBERS, G.C.; SADOVNICK, A.D. Genetics of multiple sclerosis. **Lancet Neurology**, v. 3, p. 10-104, 2004.
- EBERS, G.C.; SADOVNICK, A.D.; RISCH, N.J. A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. **Nature**, v. 377, n. 6545, p. 150-151, 1995.
- ENEVOLD, C.; OTURAI, A.B.; SORENSEN, P.S.; RYDER, L.P.; KOCH-HENRIKSEN, N.; BENDTZEN, K. Polymorphisms of innate pattern recognition receptors, response to interferon-beta and development of neutralizing antibodies in multiple sclerosis patients. **Multiple Sclerosis**, v. 16, p. 942-949, 2010.

ESPARZA, J.; KRUSE, M.; LEE, J.; MICHAUD, M.; MADRI, J.A. MMP-2 null mice exhibit an early onset and severe experimental autoimmune encephalomyelitis due to an increase in MMP-9 expression and activity. **The FASEB Journal**, v. 18, n. 14, p. 91-1682, 2004.

FALVO, J.V.; UGLIALORO, A.M.; BRINKMAN, B.M.; et al. Stimulus-specific assembly of enhancer complexes on the tumor necrosis factor alpha gene promoter. **Molecular and Cellular Biology**, v. 20, n. 6, p. 47-2239, 2000.

FERBER, I.A.; BROCKE, S.; TAYLOR-EDWARDS, C.; RIDGWAY, W.; DINISCO, C.; STEINMAN, I.; et al. Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). **The Journal of Immunology**, v. 156, n. 1, p. 5-7, 1996.

FIFE, B.T.; HUFFNAGLE, G.B.; KUZIEL, W.A.; KARPUS, W.J. CC chemokine receptor 2 is critical for induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 192, n. 6, p. 899-905, 2000.

FILION, L.G.; GRAZIANI-BOWERING, G.; MATUSEVICIUS, D.; FREEDMAN, M.S. Monocyte-derived cytokines in multiple sclerosis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 131, n. 2, p. 34-324, 2003.

FITZGERALD, K.A.; ROWE, D.C.; BARNES, B.J.; CAFFREY, D.R.; VISINTIN, A.; LATZ, E.; et al. LPSTLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappa B involves the toll adapters TRAM and TRIF. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 198, n. 7, p. 55-1043, 2003.

FRANKLIN, G.M.; LORENE, N. Environmental risk factors in multiple sclerosis. **Neurology**, v. 61, p. 34-1032, 2003.

GALIC, M.A.; RIAZI, K.; PITTMAN, Q.J. Cytokines and brain excitability. **Front. Neuroendocrinology**, v. 33, p. 116-125, 2012.

GARDINIER, M.V.; AMIGUET, P.; LININGTON, C.; MATTHIEU, J.M. Myelin/oligodendrocyte glycoprotein is a unique member of the immunoglobulin superfamily. **Journal Neuroscience Research**, v. 33, n. 1, p. 87-177, 1992.

GASPERINI, C.; GRASSO, M.G.; FIORELLI, M. A controlled study of potential risk factors preceding exacerbation in multiple sclerosis. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 59, p. 5-303, 1995.

GENAIN, C.P.; CANELLA, B.; HAUSER, S.L.; RAINE, C.S. Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. **Nature Medicine**, v. 5, n. 2, p. 170-175, 1999.

GERMAIN, R.N. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. **Cell**, v. 76, p. 99-287, 1994.

- GIMENEZ, M.A.; SIM, J.E.; RUSSELL, J.H. TNFR1-dependent VCAM-1 expression by astrocytes exposes the CNS to destructive inflammation. **Journal of Neuroimmunology**, v. 151, n. (1-2), p. 25-116, 2004.
- GIULIANE, F.; YONG, V.W. Immune-mediated neurodegeneration and neuroprotection in MS. **The International MS Journal**, v. 10, p.122-30, 2003.
- GLABINSKI, A.R.; TANI, M.; TUOHY, V.K.; TUTHILL, R.J.; RANSOHOFF, R.M. Central nervous system chemokine mRNA accumulation follows initial leukocyte entry at the onset of acute murine experimental autoimmune encephalomyelitis. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 9, n. 4, p. 30-315, 1995.
- GOLDFELD, A.E.; DOYLE, C.; MANIATIS, T. Human tumor necrosis factor alpha gene regulation by virus and lipopolysaccharide. **The Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 24, p. 73-9769, 1990.
- GOVERMAN, J. Autoimmune T cell response in the central nervous system. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 6, p. 393-407, 2009.
- GRAMANTIERI, L.; CASALI, A.; TRERE, D.; GAIANI, S.; PISCAGLIA, F.; CHIECO, P.; et al. Imbalance of IL-1 beta and IL-1 receptor antagonist mRNA in liver tissue from hepatitis C virus (HCV)-related chronic hepatitis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 115, n. 3, p. 20-515, 1999.
- GREWAL, I.S.; FOELLMER, H.G.; GREWAL, K.D.; WANG, H.; LEE, W.P.; TUMAS, D.; et al. CD62L is required on effector cells for local interactions in the CNS to cause myelin damage in experimental allergic encephalomyelitis. **Immunity**, v. 14, n. 3, p. 29-302, 2001.
- HACKER, H.; VABULAS, R.M.; TAKEUCHI, O.; HOSHINO, K.; AKIRA, S.; WAGNER, H. Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 192, n. 4, p. 595-600, 2000.
- HAFLER, D.A.; et al. Multiple sclerosis. **Immunological Reviews**, v. 204, p. 208-231, 2005.
- HANSEN, B.S.; HUSSAIN, R.Z.; LOVETT-RACKE, A.E.; THOMAS, J.A.; RACKE, M.K. Multiple toll-like receptor agonists act as potent adjuvants in the induction of autoimmunity. **Journal Neuroimmunology**, v. 172, p. 94-103, 2006.
- HARRINGTON, L.E.; HATTON, R.D.; MANGAN, P.R.; TURNER, H.; MURPHY, T.L.; MURPHY, K.M.; et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. **Nature Immunology**, v. 6, n. 11, p. 32-1123, 2005.
- HAUSER, S.L. An update on multiple sclerosis. **The Journal of Neurological Sciences**, v. 228, n. 2, p. 193-194, 2005.

HAYASHI, F.; SMITH, K.D.; OZINSKY, A.; HAWN, T.R.; YI, E.C.; GOODLETT, D.R.; et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. **Nature**, v. 410, n. 6832, p. 103-1099, 2001.

HEDEGAARD, C.J.; KRAKAUER, M.; BENDTZEN, K.; LUND, H.; SELLEBJERG, F.; NIELSEN, C.H. T helper cell type 1 (Th1), Th2 and Th17 responses to myelin basic protein and disease activity in multiple sclerosis. **Immunology**, v. 125, p. 9-161, 2008.

HEITMEIER, M.R.; ARNUSH, M.; SCARIM, A.L.; CORBETT, J.A. Pancreatic beta-cell damage mediated by beta-cell production of interleukin-1. A novel mechanism for virus-induced diabetes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 14, p. 8-11151, 2001.

HEMMI, H.; KAISHO, T.; TAKEUCHI, O.; SATO, S.; SANJO, H.; HOSHINO, K.; et al. Small antiviral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. **Nature Immunology**, v. 3, n. 2, p. 196-200, 2002.

HERNANDEZ, S.M.; BAXTER, A.G. Role of toll-like receptors in multiple sclerosis. **American Journal of Clinical and Experimental Immunology**, v. 2, p. 75-93, 2013.

HICKEY, W.F.; HSU, B.L.; KIMURA, H. T-lymphocyte entry into the central nervous system. **Journal of Neuroscience Research**, v. 28, n. 2, p. 60-254, 1991.

HOLMES, S.; et al. Multiple sclerosis: MHC associations and therapeutic implications. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 7, n. 3, p. 1-17, 2005.

IZIKSON, L.; KLEIN, R.S.; CHARO, I.F.; WEINER, H.L.; LUSTER, A.D. Resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis in mice lacking the chemokine receptor (CCR)2. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 192, n. 7, p. 80-1075, 2000.

IZIKSON, L.; KLEIN, R.S.; KLEIN, R. S.; LUSTER, A. D.; WEINER, H.L. Targeting monocyte recruitment in CNS autoimmune disease. **Clinical Immunology**, v. 103, n. 2, p. 125-131, 2002.

JELINECK, G.A.; HASSED, C.S. Managing multiple sclerosis in primary care: are we forgetting something? **Quality in Primary Care**, v. 17, p. 55-61, 2007.

JOHNS, T.G.; ROSBO, K.N.; MENON, K.K.; ABO, S.; GONZALES, M.F.; BERNARD, C.C.A. Myelin oligodendrocyte glycoprotein induces a demyelinating encephalomyelitis resembling multiple sclerosis. **The Journal of Immunology**, v. 154, p. 5536-5541, 1995.

JOHNS, T.G.; BERNARD, C.C.A. The structure and function of myelin oligodendrocyte glycoprotein. **Journal of Neurochemistry**, v. 72, p. 1-9, 1999.

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

- KANNEGANTI, T.D.; BODY-MALAPEL, M.; AMER, A.; PARK, J.H.; WHITFIELD, H.; FRANCHI, L.; et al. Critical role for Cryopyrin/Nalp3 in activation of caspase-1 in response to viral infection and double-stranded RNA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 48, p. 8-36560, 2006.
- KANTARCI, O.H.; ANDRADE, M.; WEINSHENKER, B.G. Identifying disease modifying genes in multiple sclerosis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 123, p. 144- 159, 2002.
- KAWAI, T.; ADACHI, O.; OGAWA, T.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. **Immunity**. v. 11, n. 1, p. 22-115, 1999.
- KAWAI, T.; AKIRA, S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. **International Immunology**, v. 21, n. 4, p. 37-317, 2009.
- KELLAR-WOOD, H.F.; WOOD, N.W.; HOLMANS, P.; CLAYTON, D.; ROBERTSON, N.; COMPSTON, D.A. Multiple sclerosis and the HLA-D region: linkage and association studies. **Journal of Neuroimmunology**, v. 58, p. 183-190, 1995.
- KERFOOT, S.M.; KUBES, P. Overlapping roles of P-selectin and alpha 4integrin to recruit leukocytes to the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 2, p. 6-1000, 2002.
- KERFOOT, S.M.; LONG, E.M.; HICKEY, M.J.; ANDONEGUI, G.; LAPOINTE, B.M.; ZANARDO, R.C.; et al. TLR4 contributes to disease-inducing mechanisms resulting in central nervous system autoimmune disease. **Journal of Immunology**, v. 173, n. 11, p. 7-7070, 2004.
- KLEIN, J.; SATO, A. The HLA System. First of two parts. **The New England Journal of Medicine**, v. 343, p. 9-702, 2000.
- KORN, T.; MAGNUS, T.; JUNG, S. Autoantigen specific T cells inhibit glutamate uptake in astrocytes by decreasing expression of astrocytic glutamate transporter GLAST: a mechanism mediated by tumor necrosis factor-alpha. **The FASEB Journal**, v. 19, n. 13, p. 80-1878, 2005.
- KRAMER, E.M.; SCHARDT, A.; NAVE, K. Membrane traffic in myelinating oligodendrocytes. **Microscopy Research and Techniques**, v. 52, p. 656-671, 2001.
- KROENKE, M.A.; CARLSON, T.J.; ANDJELKOVIC, A.V.; SEGAL, B.M. IL-12 and IL-23 modulated T cells induce distinct types of EAE based on histology, CNS chemokine profile, and response to cytokine inhibition. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 7, p. 41-1535, 2008.
- KROEPFL, J.F.; VIISE, L.R.; CHARRON, A.J.; LININGTON, C.; GARDINIER, M.V. Investigation of myelin/oligodendrocyte glycoprotein membrane topology. **Journal of Neurochemistry**, v. 67, n. 2219-2222, 1996.

- KUBES, P. Introduction: the complexities of leukocyte recruitment. **Seminars in Immunology**, v. 14, p. 65-72, 2002.
- 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. TLR-activated B cells suppress T cell-mediated autoimmunity. **Journal of Immunology**, v. 180, n. 7, p. 4763-4773, 2008.
- LANGRISH, C.L.; CHEN, Y.; BLUMENSCHNIG, W.M.; MATTSON, J.; BASHAM, B.; SEDGWIC, J.D.; et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 201, n. 2, p. 40-233, 2005.
- LASSMANN, H.; BRUCK, W.; LUCCHINETTI, C.F. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. **Brain Pathology**, v. 17, n. 2, p. 8-210, 2007.
- LAVI, E.; CONSTANTINESCU, C.S.; Experimental Models Of Multiple Sclerosis. **Springer Science Business Media**, p. 593-616, 2005.
- LI, Q.; POWELL, N.; ZHANG, H., et al. Endothelial IL-1R1 is a critical mediator of EAE pathogenesis. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 25, p. 7-160, 2011.
- LIM, S.Y.; CONSTANTINESCU, C.S. TNF- α : A paradigm of paradox and complexity in multiple sclerosis and its animal models. **The Journal of Autoimmunity**, v. 2, p. 160-170, 2010.
- LOPEZ-CASTEJON, G.; BROUGH, D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. **Cytokine Growth Factor Reviews**, v. 22, n. 4, p. 95-189, 2011.
- LITZENBURGER, T.; FASSLER, R.; BAUER, J.; LASSMANN, H.; LINNINGTON, C.; WEKERLE, H.; IGLESIAS, B. B lymphocytes producing demyelinating autoantibodies: development and function in gene-targeted transgenic mice. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 188, p. 169-180, 1998.
- LUBLIN, F.D. The incomplete nature of multiple sclerosis relapse resolution. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 256 Suppl 1, p. 14-18, 2007.
- MACCOY, M.K.; TANSEY, M.G. TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. **Journal of Neuroinflammation**, p. 5-45, 2008.
- MACHADO, R.; SUZANA, L. Recomendações esclerose múltipla. Omnifarma, p. 13-25, 2012.
- MAHAD, D.; CALLAHAN, M.K.; WILLIAMS, K.A.; UBOGU, E.E.; KIVISAKK, P.; TUCKY, B.; KIDD, G.; KINGSBURY, G.A.; CHANG, A.; FOX, R.J.; MACK, M.; SNIDERMAN, M.B.; RAVID, R.; STAUGAITIS, S.M.; STINS, M.F.; RANSOHOFF, R.M. Modulation CCR2 and CCL2 at the blood-brain barrier: relevance for multiple sclerosis pathogenesis. **Brain**, v. 2, p. 1-12, 2005.

- MARTA, M. Toll-like Receptors in Multiple Sclerosis Mouse Experimental Models. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1173, p. 62-458, 2009.
- MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C.A. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. **Current Opinion in Immunology**, v. 9, n. 1, p. 4-9, 1997.
- MENDEL, I.; KERLERO DE ROSBO, N.; BEN-NUN, A. A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells. **European Journal of Immunology**, v. 25, n. 7, p. 9-1951, 1995.
- MSFI, M. S. F. I. Multiple Sclerosis International Federation. Atlas of multiple sclerosis 2013.
- OBERHOLZER, A.; OBERHOLZER, C.; MOLDAWER, L.L. Cytokine signaling-regulation of the immune response in normal and critically ill states. **Critical Care Medicine**, v. 28, n. 4, p. 3-12, 2000.
- PETERSON, L.K.; ROBERT, S.; FUJINAMI, R.S. Inflammation, demyelination, neurodegeneration and neuroprotection in the pathogenesis of multiple sclerosis. **Journal of Immunology**, v. 184, p. 37-44, 2007.
- PITT, D.; WERNER, P.; RAINE, C.S. Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis. **Nature Medicine**, v. 6, n. 1, p. 67-70, 2000.
- POULY, S.; ANTEL, J.A. Multiple sclerosis and central nervous system demyelination. **Journal of Autoimmunity**, v. 13, p. 297-306, 1999.
- PRAT, A.; ANTEL, J. Pathogenesis of multiple sclerosis. **Current Opinion in Neurology**, v. 18, n.3, p. 225-230, 2005.
- 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. Innate immunity mediated by TLR9 modulates pathogenicity in an animal model of multiple sclerosis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 2, p. 456-464, 2006.
- PRINZ, M.; GARBE, F.; SCHMIDT, M.; MILDNER, A.; GUTCHER, I.; WOLTER, K.; et al. Innate immunity mediated by TLR9 modulates pathogenicity in an animal model of multiple sclerosis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 2, p. 64-456, 2006.
- RAMGOLAM, V.S.; SHA, Y.; JIN, J.; ZHANG, X.; MARKOVIC-PLESE, S. IFN- β inhibits human Th17 cell differentiation. **The Journal of Immunology**, v. 183, p. 27-5418, 2009.
- RIBEIRO, S.B.F.; MAIA, D.F.; RIBEIRO, J.B.; CARDOSO, F.A.G.; SILVA, C. Clinical and epidemiological profile of patients with multiple sclerosis in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 69, n. 2, p. 18-184, 2011.

ROSBO, N.K.; BEN-NUM, A. T-cell responses to myelin antigens in MS; relevance of the predominant autoimmune reactivity to myelin oligodendrocyte glycoprotein. **Journal Autoimmunity**, v. 11, p. 287-299, 1998.

ROSSI, S.; FURLAN, R.; DE CHIARA, V.; MORRA, C.; STUDER, V.; MORI, F.; MUSELLA, A.; BERGAMI, A.; MUZIO, L.; BERNARDI, G.; BATTISTINI, L.; MARTINO, G.; CENTONZE, D. Interleukin-1 β causes synaptic hyperexcitability in multiple sclerosis. **Annual Review of Neurology**, v. 71, p. 76-83, 2012.

SADOVNICK, A.D.; EBERS, G.C.; DYMENT, D.A.; RISCH, N.J. Evidence for genetic basis of multiple sclerosis. The Canadian Collaborative Study Group. **Lancet**, v. 347, n. 9017, p. 1728-1730, 1996.

SARESELLA, M.; GATTI, A.; TORTORELLA, P. et al. Toll-like receptor 3 differently modulates inflammation in progressive or benign multiple sclerosis. **Clinical Immunology**, v. 150, p. 20-109, 2014.

SCHIFFENBAUER, J.; STREIT, W.J.; BUTFILOSKI, E.; LABROW, M.; EDWARDS, C.; MOLDAWER, L.L. The induction of EAE is only partially dependent on TNF receptor signaling but requires the IL-1 type I receptor. **Clinical Immunology**, v. 95, p. 23-117, 2000.

SCHMIDT, S. Candidate autoantigens in Multiple Sclerosis. **Multiple Sclerosis**, v.5, p. 147-160, 1999.

SCOLDING, N.; FRANKLIN, R. Axon loss in multiple sclerosis. **Lancet**, v. 352, n. 9125, p. 340-341, 1998.

SIMMONS, S.B.; PIERSON, E.R.; LEE, S.Y.; GOVERMAN, J.M. Modeling the heterogeneity of multiple sclerosis in animals. **Trends in Immunology**, v. 34, p. 22-410, 2013.

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

STAMATOVIC, S.M.; KEEP, R.F.; KUNKEL, S.L.; ANDJELKOVIC, A.V. Potential role of MCP-1 in endothelial cell tight junction 'opening': signaling via Rho and Rho kinase **Journal of Cell Science**, v. 116, p. 4615-4628, 2003.

STAMATOVIC, S.M.; SHAKUI, P.; KEEP, R.F.; MOORE, B.B.; KUNKEL, S.L.; VAN ROOIJEN, N.; ANDJELKOVIC, A.V. Monocyte chemoattractant protein-1 regulation of blood-brain barrier permeability. **Journal of cerebral blood flow and metabolism**, v. 25, n. 5, p. 593-606, 2005.

TAKAHASHI, J.L.; GIULIANI, F.; POWER, C.; IMAI, Y.; YONG, V.W. Interleukin-1 β promotes oligodendrocyte death through glutamate excitotoxicity. **Annual Review of Neurology**, v. 53, p. 588-595, 2003.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. TLR signaling pathways. **Seminars in Immunology**, v. 16, n. 1, p. 3-9, 2004.

TAKEUCHI, O.; TAKEDA, K.; HOSHINO, K.; ADACHI, O.; OGAWA, T.; AKIRA, S. Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88dependent signaling cascades. **International Immunology**, v. 12, n. 1, p. 7-113, 2000.

TANI, M.; GLABINSKI, A.R.; TUOHY, V.K.; STOLER, M.H.; ESTES, M.L.; RANSOHOFF, R.M. In situ hybridization analysis of glial fibrillary acidic protein mRNA reveals evidence of biphasic astrocyte activation during acute experimental autoimmune encephalomyelitis. **American Journal of Pathology**. v. 148, n. 3, p. 96-889, 1996.

TANUMA, N.; SAKUMA, H.; SASAKI, A.; MATSUMOTO, Y. Chemokine expression by astrocytes plays a role in microglia/macrophage activation and subsequent neurodegeneration in secondary progressive multiple sclerosis **Acta Neuropathologica**, v. 112, n. 2, p. 195-204, 1996.

THORNBERRY, N.A.; BULL, H.G.; CHAPMAN, K.T.; HOWARD, A.D.; KOSTURA, M.J.; et al. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. **Nature**, v. 356, n. 6372, p. 74-768, 1992.

TOMPKINS, S.M.; PADILLA, J.; DAL CANTO, M.C.; TING, J.P.; VAN KAER, L.; MILLER, S.D. De novo central nervous system processing of myelin antigen is required for the initiation of experimental autoimmune encephalomyelitis. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 8, p. 83-4173, 2002.

TOUIL, T.; FITZGERALD, D.; ZHANG, G.X.; ROSTAMI, A.; GRAN, B. Cutting Edge: TLR3 Stimulation Suppresses Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Inducing Endogenous IFN. **Journal of Immunology**, v. 177, p. 9-7505, 2006.

TRAN, E.H.; PRINCE, E.N.; OWENS, T. IFN-gamma shapes immune invasion of the central nervous system via regulation of chemokines. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 5, p. 68-2759, 2000.

VAN NOORT, J.M.; AMOR, S.; BAKER, D.; LAYWARD, L.; MCCORMACK, K. Multiple Sclerosis: variations on a theme. **Immunology Today**, v. 18, p. 368-371, 1997.

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

WAGNER, H. The immunobiology of the TLR9 subfamily. **Trends in Immunology**, v. 25, p. 6-381, 2004.

WALDNER, H.; COLLINS, M.; KUCHROO, V.K. Activation of antigen-presenting cells by microbial products breaks self tolerance and induces autoimmune disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 113, p. 990-997, 2004.

- WARREN, K.G.; CATZ, I.; STEINMAN, L. Fine specificity of the antibody response to myelin basic protein in the central nervous system in multiple sclerosis: The minimal B-cell epitope and a model of its features. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 92, p. 11061-11065, 1995.
- WEWERS, M.D.; DARE, H.A.; WINNARD, A.V.; PARKER, J.M.; MILLER, D.K. IL-1 beta-converting enzyme (ICE) is present and functional in human alveolar macrophages: macrophage IL-1 beta release limitation is ICE independent. **Journal of Immunology**, v. 159, n. 12, p. 72-5964, 1997.
- WILLENBORG, D.O.; FORDHAM, S.; BERNARD, C.C.; COWDEN, W.B.; RAMSHAW, I.A. IFN-gamma plays a critical down regulatory role in the induction and effector phase of myelin oligodendrocyte glycoprotein induced autoimmune encephalomyelitis. **The Journal of Immunology**, v. 157, n. 8, p. 7-3223, 1996.
- WILLENBORG, D.O.; FORDHAM, S.A.; STAYKOVA, M.A.; RAMSHAW, I.A.; COWDEN, W.B. IFN-gamma is critical to the control of murine autoimmune encephalomyelitis and regulates both in the periphery and in the target tissue: a possible role for nitric oxide. **The Journal of Immunology**, v. 163, n. 10, p. 86-5278, 1999.
- WINGERCHUK, D.M.; LUCCHINETTI, C.F.; NOSEWORTHY, J.H. Multiple sclerosis: Current Pathophysiological concepts. **Laboratory Investigation**, v. 81, n. 3, p. 263-281, 2001.
- WHO, W. H. O. World Health Organization. Federation MSI. Atlas: multiple sclerosis resources in the world 2008.
- YAMAMOTO, M.; SATO, S.; MORI, K.; HOSHINO, K.; TAKEUCHI, O.; TAKEDA, K.; et al. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. **Journal of Immunology**, v. 169, n. 12, p. 72-6668, 2002.
- YANG, G.; PARKHURST, C.N.; HAYES, S.; GAN, W.B. Peripheral elevation of TNF- α leads to early synaptic abnormalities in the mouse somatosensory cortex in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 110, p. 11-10306, 2013.
- YOUNG, C.A. Factors predisposing to the development of multiple sclerosis. **Advance Access Publication**, v. 104, p. 6-383, 2011.
- ZEKKI, H.; FEINSTEIN, D.L.; RIVEST, S. 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**, v. 12, n. 3, p. 308-319, 2002.
- ZHANG, L.; YUAN, S.; CHENG, G.; GUO, B. Type I IFN promotes IL-10 production from T cells to suppress Th17 cells and Th17-associated autoimmune inflammation. **PLoS One**, v. 6, p. 45-70, 2011.

ZIPP, F.; WINDERMUTH, C.; PANKOW, H.; DICHGANS, J.; WIENKER, T.; MARTIN, R.; MULLER, C. Multiple sclerosis associated aminoacids of polymorphic regions relevant for HLA binding are confined to HLA-DR2. **Human Immunology**, v. 61, p. 1021-1030, 2000.

ZHOU, L.; IVANOV, I.L.; SPOLSKI, R., et al. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. **Nature Immunology**, v. 8, p. 64-967, 2007.

