



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Morgana Marques Mello Vieira

Estudo do perfil funcional das células T de pacientes com esclerose múltipla e sua relação com o grau de incapacidade neurológica e resposta *in vitro* ao glicocorticoide

Rio de Janeiro

2013

Morgana Marques Mello Vieira

Estudo do perfil funcional das células T de pacientes com esclerose múltipla e sua relação com o grau de incapacidade neurológica e resposta *in vitro* ao glicocorticóide



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de Concentração: Microbiologia Médica Humana.

Orientadores: Prof^a Dra Cleonice Alves de Melo Bento

Prof. Dr. Arnaldo Feitosa Braga de Andrade

Rio de Janeiro

2013

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

V718 Vieira, Morgana Marques Mello.

Estudo do perfil funcional das células T de pacientes com esclerose múltipla e sua relação com o grau de incapacidade neurológica e resposta *in vitro* ao glicocorticóide / Morgana Marques Mello Vieira. - 2013.
77 f.

Orientadora: Cleonice Alves de Melo Bento.

Coorientador: Arnaldo Feitosa Braga de Andrade.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Microbiologia.

1. Células T - Teses. 2. Esclerose múltipla - Teses. 3. Glicocorticóides – Teses. 4. Células Th17 - Imunologia. 5. Monócitos – Teses. 6. Lipossacarídeos – Imunologia. 7. Doenças auto-imunes do sistema nervoso – Imunologia. I. Bento, Cleonice Alves de Melo. II. Andrade, Arnaldo Feitosa Braga de. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV Título.

CDU 616.832-004.2:612.112.94:615.357

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Morgana Marques Mello Vieira

Estudo do perfil funcional das células T de pacientes com esclerose múltipla e sua relação com o grau de incapacidade neurológica e resposta *in vitro* ao glicocorticóide.

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de Concentração: Microbiologia Médica Humana.

Aprovada em 20 de fevereiro de 2013.

Orientadores:

Prof^ª Dra Cleonice Alves de Melo Bento
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Arnaldo Feitosa Braga de Andrade
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Banca examinadora:

Prof. Régis Mariano de Andrade
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Prof. Raphael Hirata Júnior
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof^ª Dr^a Vera Carolina Bordallo Bittencourt
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2013

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por sempre acreditarem nos meus sonhos.

Ao meu marido pela compreensão, paciência e companherismo.

A todos os meus amigos, especialmente Rachel, por sempre estarem do meu lado.

Aos amigos do LIILT, Régis, Joana, Thaís, Priscila, Taíssa e Bruna pelo árduo trabalho coletivo que permitiu a conclusão deste projeto.

A todos os professores que lecionaram durante o curso por se esforçarem em formar não só profissionais mas também cidadãos.

Ao professor Arnaldo Feitosa Braga de Andrade pelo apoio científico e financeiro ao projeto.

E principalmente à Dra. Cleonice Alves de Melo Bento, sem a qual nada disso seria possível.

A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter
novos olhos.

Marcel Proust

RESUMO

Vieira, M.M. *Estudo do perfil funcional das células T de pacientes com Esclerose Múltipla e sua relação com o grau de incapacidade neurológica e resposta in vitro ao glicocorticoide*. 2013. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

A esclerose múltipla (EM) é uma doença progressiva autoimune que afeta o sistema nervoso central tendo como alvos peptídeos das proteínas dos oligodendrócitos, célula formadora da bainha de mielina. Apesar de estudos sobre eventos imunes conduzidos em pacientes com EM na fase ativa da doença terem demonstrado o envolvimento das células Th17 na imunopatogênese, poucos dados existem sobre o perfil imune desses indivíduos durante a fase de remissão. Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi avaliar aspectos funcionais das células T de pacientes com EM recorrente-remitente (EM-RR) na fase de remissão clínica e sua relação com o grau de incapacidade neurológica e resposta *in vitro* à hidrocortisona (HC). Nossos resultados demonstraram que a proliferação de células T induzida por fitohemaglutinina foi inferior nas culturas de pacientes com EM-RR, quando comparada a indivíduos saudáveis. A HC, no entanto, foi menos eficaz em reduzir a proliferação das células T nas culturas obtidas dos pacientes com EM-RR. Dentre as citocinas do tipo Th1 (IFN- γ e IL-2) e Th2 (IL-4 e IL-5), apenas a produção de IL-2 foi significativamente inferior nas culturas contendo células T policlonalmente ativadas dos pacientes. Por outro lado, a produção de citocinas relacionadas ao fenótipo Th17, TNF- α , IL-6 e IL-17, foi significativamente superior nas culturas dos pacientes com EM-RR, quando comparado ao grupo controle. Apesar dessa maior produção de IL-17 observada nas culturas dos pacientes, nenhuma diferença foi observada, entre os dois grupos, quanto à produção de citocinas anti-inflamatórias, a IL-10 e o TGF- β . Entretanto, a adição de HC foi menos eficaz em reduzir a produção de IL-17 pelas culturas de células dos pacientes com EM-RR. Finalmente, a maior tendência em montar uma resposta típica Th17 nos pacientes foi diretamente relacionada tanto à maior produção *in vitro* de IL-23 e IL-6 por monócitos estimulados com LPS, quanto à maior dosagem *in vivo* de LPS. Em resumo, nossos resultados demonstram que, mesmo na remissão clínica, citocinas relacionadas ao fenótipo Th17 são dominantes em culturas de células T de pacientes com EM-RR e que essa forte tendência deve estar relacionada, ao menos em parte, a maior sensibilização das células da imunidade inata pelo LPS circulante e a menor sensibilidade à inibição pelos glicocorticóides.

Palavras-chave: Esclerose Múltipla. Glicocorticoide. Th17. Monócitos. LPS.

ABSTRACT

The multiple sclerosis (MS) is a progressive autoimmune disease of central nervous system, having by targets the peptides of the oligodendrocytes proteins, cell responsible for the formation of the myelin sheath. Although studies about the immune events in MS patients during clinical relapses have demonstrated the involvement of Th17 cells in the immunopathogenesis, few data are available concerning the immune profile from these patients during remission phase. In this context, the objective of this study was evaluate functional aspects of T cells from remittent-recurrent MS (RR-MS) patients during the clinical remission and their relationship with neurological disabilities and the *in vitro* hidrocortisone (HC) response. Our results demonstrated that T cell proliferation induced by phytohemagglutinin (PHA) was lower in cell cultures from RR-MS patients, as compared with healthy individuals. The HC, however, was less potent in reducing T cell proliferation in cell cultures from RR-MS patients, as compared with control group. Among Th1 (IFN- γ and IL-2) and Th2 (IL-4 e IL-5) cytokines, only the production of IL-2 was significantly lower in cultures containing policlonally-activated T cells from patients. On the other hand, the production of Th17-related cytokines TNF- α , IL-6 and IL-17 was significantly higher in cell cultures from RR-MS patients, as compared with control group. Although higher IL-17 production in cell cultures from patients, no difference was observed with regard to anti-inflammatory cytokines production, IL-10 and TGF- β , between the two groups studied. Nevertheless, the addition of HC was less efficient in reducing IL-17 production by cell cultures from RR-MS patients. Finally, higher tendency in mounting Th17 response in patients was directly related to both higher LPS-induced *in vitro* IL-23 and IL-6 production by monocytes and higher *in vivo* LPS dosage. In summary, our results demonstrated that, even during clinical remission, Th17-related cytokines are dominant in T cells cultures of RR-MS patients, and this strong tendency should be related, at least in part, to higher sensibilization of innate immune cells by peripheral LPS and lower sensibility to inhibition to glucocorticoids.

Keywords: Multiple Sclerosis. Glucocorticoid. Th17. Monocytes. LPS.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1-	Os sistemas funcionais avaliados no âmbito da escala EDSS	17
Figura 1-	Placas características de lesões por EM mostradas em ressonância.....	19
Figura 2-	Ativação, diferenciação e função efetora das células T CD4.....	23
Figura 3-	Regulação da resposta imune mediada pelas células T reguladoras.....	26
Figura 4-	Resposta proliferativa das células T de pacientes com EM-RR em presença de hidrocortisona	40
Figura 5-	Análise do perfil <i>in vitro</i> de citocinas do tipo Th1/Th2 em pacientes com EM-RR	41
Figura 6-	Produção de citocinas relacionadas ao fenótipo Th17 em culturas de células de pacientes com EM-RR	42
Figura 7-	Análise do perfil <i>in vitro</i> de citocinas do tipo Treg em pacientes com EM-RR	43
Figura 8-	Correlação entre os níveis de IL-17 e a pontuação de EDSS dos pacientes com EM-RR	44
Figura 9-	Efeito do glicocorticóide sobre a produção <i>in vitro</i> de IL-17 em pacientes com EM-RR	45
Figura 10-	Produção de IL-12, IL-23 e IL-6 em cultura de monócitos de pacientes com EM-RR	46
Figura 11-	Quantificação dos níveis plasmáticos de LPS e sua relação com o grau de incapacidade neurológica nos pacientes com EM-RR	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- A escala EDSS.....	18
Tabela 2- Receptores do tipo Toll (TLR) como sensores dos padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) e de sinais endógenos de perigo (DAMPs) ..	32
Tabela 3- Características dos indivíduos.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS

[³ H] TdR	Nucleotídeo timidina tritiada
APC	Célula apresentadora de antígenos
CD	Grupo de diferenciação
CFA	Adjuvante completo de Freund
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
CpG-ODN	Oligodeoxinucleotídeo contendo a sequência CpG
Cpm	Contagem por minuto
CTL	Linfócito T citotóxico
CTLA-4	Antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico
DAMP	Padrão molecular associado ao dano
DC	Célula dendrítica
DNA	Ácido desoxirribonucléico
Dp	Desvio-padrão
dsRNA	Ácido ribonucléico de fita dupla
EAE	Encefalite autoimune experimental
EAO	Espécies ativas de oxigênio
EBV	Vírus Epstein-Barr
EDSS	Escala do status de incapacidade neurológica expandida
ELISA	Ensaio imunossorvente ligado à enzima
EM	Esclerose múltipla
FoxP3	Fator de transcrição forkhead box P3
GC	Glicocorticoides
GITR	Receptor do TNF induzido por glicocorticoide
HC	Hidrocortisona
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HLA	Antígeno leucocitário humano
HPA	Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
iTreg	Célula T reguladora induzida

Jak	Fator de transcrição Janus quinase
LAL	Ensaio de lisado de amebócitos de Limulus
LPS	Lipopolissacarídeo
MALP2	Lipopeptídeo 2 de micoplasma ativador de macrófagos
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MOG	Glicoproteína de oligodendrócito associada á mielina
MTA	Mielite transversa aguda
MYD	Gene de resposta primária de diferenciação mieloide
NFκB	Fator nuclear da cadeia kappa B
NK	Célula assassina natural
NLR	Receptor do tipo Nod
NMO	Neuromielite óptica
NO	Neurite óptica
NTreg	Célula T reguladora natural
ON	Óxido nítrico
OxLDL	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
PAMP	Padrão molecular associado a patógenos
PHA	Fitohematoglutinina
PLP	Proteolípídeo
Polil:C	Ácido poli-inosínico-policitídílico
PP	progressiva primária
PRR	Receptor de reconhecimento de padrões
PS	Progressiva secundária
RIG	Gene 1 induzido pelo ácido retinóico
RNA	Ácido ribonucléico
ROR-C	Receptor C orfan relacionado ao RAR
RR	Recorrente-remitente
RSV	Vírus sincicial respiratório
SF	Sistema funcional
SFB	Soro fetal bovino
SNC	Sistema nervoso central
SNS	Sistema nervoso simpático
ssRNA	Ácido ribonucléico de fita simples
STAT	Transdutor de sinal e ativador de transcrição

TCR	Receptor da célula T
TGF	Fator de crescimento transformado
Th1	Célula T helper ou auxiliadora do tipo 1
Th17	Célula T helper ou auxiliadora do tipo 17
Th2	Célula T helper ou auxiliadora do tipo 2
Th3	Célula T helper ou auxiliadora do tipo 3
TLR	Receptor do tipo Toll
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
TNF	Fator de necrose tumoral
Tr1	Célula T reguladora do tipo 1
Treg	Célula T reguladora

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	OBJETIVOS	34
1.1	Objetivo geral	34
1.2	Objetivos específicos	34
2	METODOLOGIA	35
2.1	Pacientes	35
2.2	Culturas de células mononucleares do sangue e estímulo	35
2.3	Ensaio de proliferação celular	36
2.4	Determinação de citocinas	37
2.5	Dosagem de LPS	37
2.6	Análise estatística	38
3	RESULTADOS	39
3.1	Impacto da hidrocortisona na resposta proliferativa das células T de pacientes com EM-RR	39
3.2	Análise do perfil de citocinas em culturas de células T ativadas obtidas de pacientes com EM-RR	40
3.3	Correlação entre a produção <i>in vitro</i> de IL-17, incapacidade neurológica e resposta à hidrocortisona	43
3.4	Dosagem das citocinas IL-12, IL-23 e IL-6 produzidas por monócitos de pacientes com EM-RR em resposta ao LPS	46
3.5	Quantificação dos níveis plasmáticos de LPS em pacientes com EM-RR .	47
4	DISCUSSÃO	49
5	CONCLUSÕES	57
	REFERÊNCIAS	58
	ANEXO A- Termo de consentimento livre e esclarecido	73
	ANEXO B- Comitê de ética em pesquisa	76

INTRODUÇÃO

A esclerose múltipla (EM) é uma doença progressiva autoimune que afeta o sistema nervoso central (SNC) causando destruição da bainha de mielina, estrutura fundamental na transmissão do impulso nervoso (Adams; Victor, 1989). A EM pode envolver qualquer parte do SNC, de modo que a lista de sinais e sintomas pode ser infinita (Haegert; Swift; Benedikz, 1996). Caracteristicamente a doença é descrita como disseminada no tempo e no espaço, o que implica comprometimento de diversas áreas do SNC e em épocas diferentes. A EM afeta principalmente adultos jovens, entre 20 a 40 anos de idade, e leva à significativa disfunção neurológica. A doença é mais comum em mulheres, e estima-se que no mundo mais de 2 milhões de pessoas tenham EM.

Com etiologia multifatorial, eventos imunológicos e ambientais podem contribuir direta ou indiretamente para a determinação da evolução clínica da doença. Passados alguns anos, os principais esforços têm sido concentrados na elucidação dos eventos imunes envolvidos na indução, especificidade antigênica e regulação na fase aguda em modelos experimentais da EM em camundongos, a chamada encefalomielite autoimune experimental (EAE, do inglês “experimental autoimmune encephalomyelitis”). Por outro lado, em humanos poucos artigos referentes à avaliação imunofuncional do paciente com EM foram particularmente conduzidos em pacientes na fase ativa da doença. Um estudo dos aspectos imunes na fase de remissão pode ajudar, no entanto, a prever o curso natural da doença assim como contribuir na identificação de marcadores preditivos da resposta à terapêutica durante as recaídas clínicas.

Esclerose múltipla: a doença

Na maioria dos pacientes a doença se manifesta clinicamente como uma síndrome isolada sugestiva de EM, tipicamente com neurite óptica, síndrome tronco-encefálico ou mielite. Com o estabelecimento da EM, a doença pode seguir diferentes cursos: recorrente-remitente (RR), progressiva primária (PP) e progressiva secundária (PS) (Shibasaki; McDonald; Kuroiwa, 1981). A forma RR é diagnosticada na maioria dos casos de EM (>

80%) e caracteriza-se por apresentar episódios agudos de comprometimento neurológico, com duração mínima de 24 horas e com no mínimo trinta dias de intervalo entre cada surto (Schumacher *et al.*, 1965). A forma PS representa, na verdade, uma progressão da forma RR. O que dispara a mudança de uma forma mais inflamatória e responsiva a terapia imunossupressora para uma forma secundária progressiva, neurodegenerativa e refratária ao tratamento não é conhecido. A forma PP é caracterizada por um curso progressivo já seguindo a primeira manifestação da doença e é totalmente refratária ao tratamento correntemente disponível.

Os sintomas iniciais mais comuns compreendem alterações piramidais, sensitivas e cerebelares, conhecidas como sinais maiores, e manifestações visuais e esfínterianas, ditos menores (Poser; Poser, 1983). Os sinais piramidais englobam fraqueza, espasticidade, sinais de liberação piramidal. As alterações cerebelares podem ser divididas em comprometimento do equilíbrio e da coordenação. Os principais distúrbios visuais são diminuição da acuidade visual, diplopia e escotomas, quase sempre reconhecidos como embaçamento visual. O comprometimento esfínteriano apresenta-se sob a forma de incontinência ou retenção urinária e fecal. A fadiga, que costuma estar associada à ansiedade e depressão, é uma queixa muito comum e pode ser o sintoma mais limitante. Alterações cognitivas podem acometer de 13% a 65% dos pacientes com EM. A aplicação sistemática de testes neuropsicológicos revela especialmente alteração de memória.

Seguindo a avaliação da extensão dos distúrbios nos sistemas funcionais (SFs, Quadro 1), os pacientes com EM são estadiados utilizando a escala chamada *Expanded Disability Status Scale* (EDSS) (Tabela 1), que mede o grau de incapacidade neurológica do paciente (Kurtzke, 1983). O EDSS possui 10 itens com valores variando de 0 a 10, com pontuação aumentando em meio ponto conforme o grau de incapacidade do paciente, dando maior enfoque à capacidade de deambulação do paciente (principalmente quando o EDSS é > 4,0). Esta classificação vai desde o normal, que é zero, até à incapacidade máxima, quando o valor do EDSS é superior a 6.

Quadro 1. Os sistemas funcionais avaliados no âmbito da escala EDSS

✓	Funções Piramidais - movimento voluntário
✓	Funções do Tronco-cerebral - movimento dos olhos, sensação e movimento da face, engolir
✓	Funções Visuais (ou Ópticas)
✓	Funções Cerebrais (ou Mentais)- memória, concentração, humor
✓	Funções Cerebelares - coordenação do movimento ou equilíbrio
✓	Funções Sensitivas
✓	Funções Intestinais e Vesicais
✓	Outras Funções - incluindo a fadiga

Tabela 1. A Escala EDSS¹.

DSS	Déficit neurológico
	Exame neurológico normal
	Ausência de incapacidade funcional e exame com achados anormais mínimos
	Incapacidade funcional mínima em apenas um sistema funcional
	Capaz de andar sem ajuda, mas com incapacidade moderada em um dos sistemas funcionais
	Capaz de andar sem ajuda pelo menos 500 metros, mas tem incapacidade grave em um dos sistemas funcionais
	Capaz de andar sem ajuda pelo menos 200 metros, mas a incapacidade é muito grave para estar apto para o trabalho a tempo inteiro
	Precisa de uma bengala, muleta ou outra ajuda para andar 100 metros, com ou sem pausas
	Não consegue andar mais de 5 metros, mesmo com ajuda, pode mover a cadeira de rodas e transferir-se sem ajuda
	Restringido à cadeira, cama ou cadeira de rodas, braços funcionais mas necessita de assistência para a transferência
	Acamado e totalmente dependente, braços não funcionais, mas pode comer e falar
0	Morte devida à EM (muito raro)

¹Expanded Disability Status Scale (Kurtze, 1983)

Imunohistopatologia da esclerose múltipla

A EM é caracterizada por desmielinização, inflamação multifocal e perda axonal e de oligodendrócitos (Adams; Victor, 1989). Macroscopicamente as lesões são identificadas na ressonância como placas acinzentadas de tamanhos variados (Adams; Victor, 1989). (Figura 1) As placas antigas apresentam-se bem demarcadas, enquanto as mais novas, por causa do

edema, possuem limites imprecisos. Em casos de longa duração, nota-se atrofia cerebral com alargamento dos ventrículos laterais.

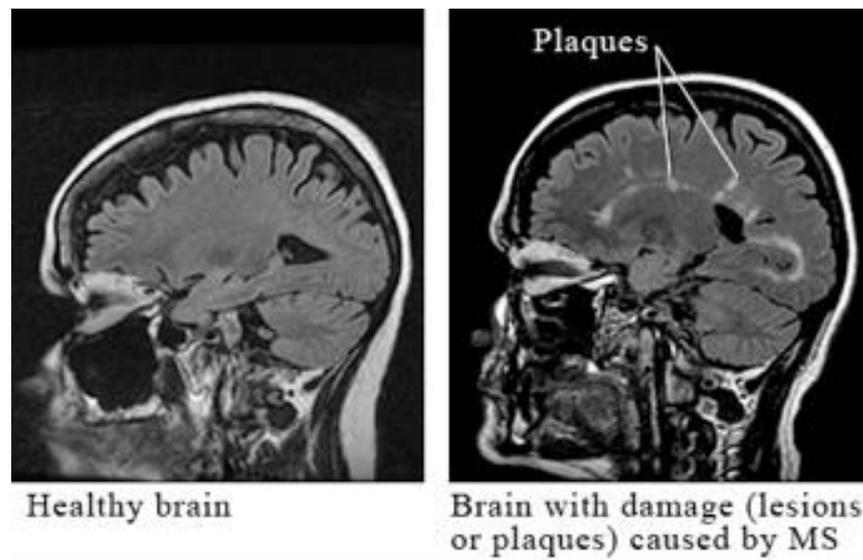


Figura 1. Placas características de lesões por EM mostradas em ressonância.

Achados a partir das amostras de tecido cerebral e medular de pacientes que veio a óbito por EM revelaram um acúmulo perivascular de células T oligoclonais consistindo de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, monócitos e células B ocasionais com infrequentes plasmócitos (Steinman, 2001). Linfócitos T podem ser encontrados também na matéria branca aparentemente normal adjacente às lesões agudas. Por outro lado, os macrófagos são mais proeminentes no centro das placas contendo fragmentos de mielina onde a contagem de oligodendrócitos é reduzida (Lucchinetti *et al.*, 2000). Nas lesões ativas crônicas, o infiltrado inflamatório celular é menos proeminente e é largamente restrito à borda da placa, sugerindo a presença de uma atividade inflamatória basal (Lucchinetti *et al.*, 2000). Finalmente, placas com evidência escassa de inflamação são também descritas como lesões crônicas inativas (Lucchinetti *et al.*, 2000).

Bases imunológicas da esclerose múltipla: modelo em construção

Os linfócitos Th1 e Th17 e a esclerose múltipla

A EM ocorre em indivíduos geneticamente predisponentes seguindo exposição a eventos ambientais que ativam as células T mielina-específicas permitindo que estas ataquem o sistema nervoso central (SNC). Entretanto, muito de nosso conhecimento acerca das bases moleculares e celulares da imunopatologia da EM tem sido obtido através do modelo experimental da doença em camundongos, a encefalomielite autoimune experimental (EAE). Na cinética da resposta imune celular da EAE, células dendríticas (DCs, do inglês “dendritic cells”), que são consideradas as melhores células apresentadoras de antígeno do sistema imune (Almolda; Gonzalez; Castellano, 2011), ativam os linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ contra antígenos da bainha de mielina no contexto de uma reação inflamatória nos gânglios paracervicais (Ando *et al.*, 1989). Uma vez ativadas, essas células passam a expressar níveis elevados de várias moléculas de adesão e receptores de quimiocinas que facilitam sua entrada no parênquima cerebral (Kebir *et al.*, 2009). Quanto ao fenótipo, por muitos anos acreditava-se que as células T CD4⁺ Th1(T *helper* 1) ativadas pelas DCs seriam as únicas implicadas na imunopatologia da EAE e da EM (Yura *et al.*, 2001).

Células Th1 representam um subtipo funcional de células T CD4⁺ induzido pelas DCs através da secreção de interleucina-12 (IL-12) (Zhu *et al.*, 2010). Os linfócitos Th1, quando ativados, secretam grandes quantidades de IL-2 e interferon- γ (IFN- γ), e medeiam uma resposta conhecida como imunidade celular, por envolver, majoritariamente, a ativação de fagócitos. O IFN- γ , porém, não apenas aumenta o poder microbicida dos fagócitos humanos (macrófagos e neutrófilos), como também amplifica a função lítica das células assassinas naturais (NK, do inglês “natural killer”) e a produção de anticorpos das classes IgG1 (imunoglobulina G1) e IgG3 pelos linfócitos B humanos (Mckinstry *et al.*, 2010). Os eventos envolvidos na resposta imune celular são fundamentais para controlar todas as bactérias e protozoários que causam infecções intracelulares (Romagnani, 1999). Ademais, por auxiliar as células T CD8⁺, os linfócitos Th1 são imperativos numa boa resposta contra vírus e tumores (Obar; Lefrançois, 2010). Nesse sentido, as células T CD8⁺ clássicas quando ativadas pelas DCs se transformam em linfócitos citotóxicos (CTL, do inglês “cytotoxic T lymphocytes”) (Coquerelle; Moser, 2010). Esses CTLs eliminam células infectadas por vírus

ou transformadas através da liberação de um poderoso arsenal de proteínas líticas, conhecidas como perforinas e granzimas, que induzem a morte do alvo por apoptose (Coquerelle; Moser, 2010). (Figura 2)

A descrença sobre o envolvimento soberano das células Th1 como protagonista na gênese da EM veio a partir dos dados publicados em numerosos estudos conduzidos em camundongos deficientes nas citocinas relacionadas a esse fenótipo de célula T CD4⁺ (Lovett-Racke; Yang; Racke, 2011). Esses trabalhos demonstraram que animais deficientes em IL-12 e IFN- γ desenvolveram quadro severo de incapacidade neurológica seguindo a indução de EAE (Ferber *et al.*, 1996; Willenborg *et al.*, 1996; Lublin *et al.*, 1993; Chu *et al.*, 2000; Becher *et al.*, 2002). Em contraste, camundongos deficientes em IL-23 ou em IL-6 eram completamente resistentes a EAE (Okuda *et al.*, 1998; Cua *et al.*, 2003; Langrish *et al.*, 2005).

A IL-23 é uma citocina crucial para o desenvolvimento de células Th17, uma distinta linhagem de células T CD4⁺ que é caracterizada pela produção de IL-17 (também conhecida como IL-17A), IL-17F e IL-22 e IL-21 (Gutcher; Becher, 2007) (Figura 2). A habilidade das células Th17 em produzir essas citocinas inflamatórias e sua capacidade em induzir outras células a sintetizar IL-6, metaloproteinases de matriz e CXCL8 (IL-8), potente quimioatraente de neutrófilos, sugere que esses linfócitos Th possam contribuir para dano neuronal característico da EM (Miossec, 2009).

Indícios sobre a participação das células Th17 em pacientes com EM também tem sido descritos em estudos clínicos (Brucklacher-Waldert *et al.*, 2009). Elevados níveis de transcritos de RNA mensageiro para IL-17 foram detectados nas lesões crônicas de pacientes com EM, quando comparado com as lesões agudas (Lovett-Racke; Yang; Racke, 2011; Matusевичius *et al.*, 1999; Lock *et al.*, 2002). Níveis séricos e líquóricos elevados de metaloproteinase do tipo 9 nos pacientes com EM foram diretamente relacionados ao rompimento da bainha hemato-encefálica e a atividade clínica e radiológica da doença (Lovett-Racke; Yang; Racke, 2011). Ademais, a migração das células Th17 para o SNC é facilitado pela expressão, nesses linfócitos, da molécula CCR6 (Revel *et al.*, 1995). O ligante do CCR6, a quimiocina CCL20, é expressa constitutivamente pelas células epiteliais do plexo coróide em humanos (Wolburg; Paulus, 2010). Evidências a partir de estudos de imagem confirmam que o espaço subaracnóide é o primeiro sítio onde as células T CD4⁺, previamente ativadas na periferia, são reativadas (Wolburg; Paulus, 2010). Quando dentro do parênquima cerebral e medular, a produção *in situ* de níveis elevados de citocinas inflamatórias por esses

linfócitos induz a expressão de diferentes moléculas de adesão e produção de quimiocinas pelas células endoteliais perivasculares, amplificando assim o recrutamento de outras células T para o espaço perivascular (Lovett-Racke; Yang; Racke, 2011). Perifericamente, expressão elevada de IL-17 e IL-6 tem sido detectada nas células mononucleares de pacientes durante as recaídas clínicas (Lovett-Racke; Yang; Racke, 2011), assim como a frequência de células Th17 aumenta significativamente no líquido de pacientes com EM-RR durante as crises clínicas (Brucklacher-Waldert *et al.*, 2009).

Apesar dos dados atuais apontarem um maior envolvimento dos linfócitos Th17 na fisiopatogenia da EM, para a maioria dos pesquisadores, as citocinas produzidas por Th1 continuam sendo importantes no dano neuronal. Níveis elevados de IL-12, citocina envolvida na indução de Th1, têm sido detectados nos sangue periférico de pacientes com EM em surto clínico e têm sido correlacionados ao déficit neurológico, medido pelo EDSS (Brucklacher-Waldert *et al.*, 2009; Skurkovich *et al.*, 2001). O IFN- γ , citocina clássica do fenótipo Th1, induz apoptose de oligodendrócitos humanos, e nas lesões da EM, a expressão de IFN- γ co-localiza-se com oligodendrócitos em apoptose (Kebir *et al.*, 2009). Ademais, no modelo EAE, apesar da transferência de células Th17 induzir uma doença mais severa, camundongos que receberam células Th1 mielina-específicas também apresentaram um certo grau de déficit neurológico (Lovett-Racke; Yang; Racke, 2011). Para alguns autores, no início dos surtos clínicos citocinas relacionadas tanto ao fenótipo Th1 quanto Th17 parecem estar envolvidas nas lesões medulares (Lovett-Racke; Yang; Racke, 2011). Entretanto, à medida que a doença progride, células produtoras de IL-17 passam a ser dominantes no infiltrado inflamatório (Lovett-Racke; Yang; Racke, 2011). Esses resultados sugerem, portanto, que ambos fenótipos de células T CD4⁺ contribuem, com cinéticas diferentes, no curso da doença.

Finalmente, além das células T CD4⁺, os linfócitos T CD8⁺ devem executar um papel importante na imunopatologia da EM. Por exemplo, estudos têm demonstrado que o desenvolvimento de novas lesões no SNC tem sido principalmente correlacionado com o nível de infiltração medular de células T CD8⁺ periféricas, melhor do que células T CD4⁺ (Bjartmar; Wujek; Trapp, 2003). Os mecanismos lesivos mediados pelos linfócitos TCD8⁺ no processo de desmielinização envolvem a direta liberação de proteínas tóxicas, as perforinas e granzimas, e a secreção de IFN- γ , fator de necrose tumoral α (TNF- α) e IL-17 que induzem, por exemplo, a produção de radicais livres derivados do oxigênio conduzindo a morte dos oligodendrócitos (Bjartmar; Wujek; Trapp, 2003).

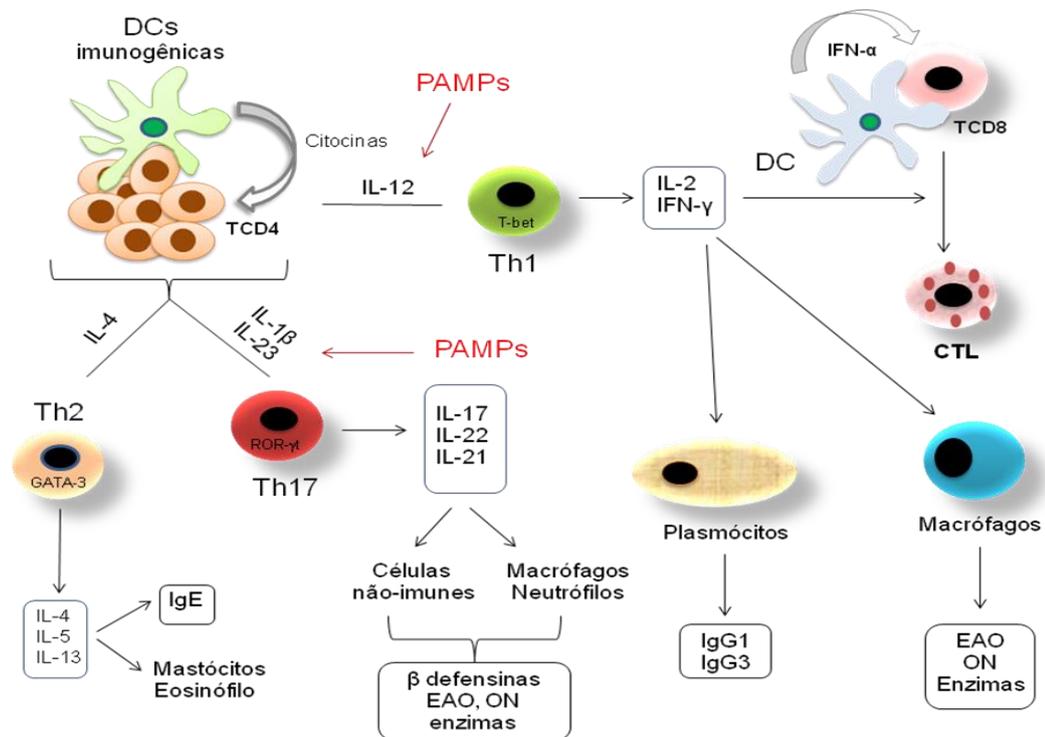


Figura 2. Ativação, diferenciação e função efetora das células T CD4⁺.

Representamos aqui os principais fenótipos efetores que as células T CD4⁺ virgens podem assumir quando ativada por uma célula dendrítica imunogênica (DC). A diferenciação em Th1, Th2 ou Th17 dependerá principalmente do perfil de citocinas dominante no momento da ativação das células T. Nesse sentido, enquanto a IL-4 favorece a diferenciação das células T CD4⁺ virgens em Th2, a montagem de uma resposta imune mediada por Th1 depende da presença de IL-12 no momento de sua ativação pela DC. As citocinas produzidas pelas células Th2 (particularmente a IL-4, IL-5 e IL-13) induzem uma resposta humoral caracterizada pela produção de IgE e ativação de mastócitos e eosinófilos, que, junto com a IgE, participam da resposta imune contra os helmintos. Na resposta imune mediada por Th1, a citocina IFN- γ ajuda a eliminar patógenos intracelulares por aumentar o poder microbicida dos fagócitos [por elevar a produção de espécies ativas do oxigênio (EAO), óxido nítrico (ON) e das enzimas catepsinas] e induzir células B humanas a secretar IgG1 e IgG3, que amplificam diretamente os mecanismos de controle das infecções por aumentar a fagocitose dos mesmos e indiretamente, por ativar as proteínas do sistema complemento. A IL-2, que é outra citocina importante produzida pelas células Th1, é fundamental na resposta contra a maioria dos vírus tanto por elevar a função citotóxica das células T CD8⁺ ativadas quanto por auxiliar na manutenção de memória desses linfócitos. Finalmente, a indução de diferenciação das células T CD4⁺ em células Th17 depende, em humanos, da produção, pela DC, de IL-1 β e IL-23, sendo esse evento amplificado pela IL-6. Na resposta imune mediada pelo fenótipo Th17, grandes quantidades de IL-17, IL-21 e IL-22 são produzidas que, caracteristicamente, facilitam a infiltração de neutrófilos no local de infecção por bactérias extracelulares e fungos. Na figura se destaca o papel de alguns padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) em favorecer a diferenciação das células T CD4⁺ em Th1 e/ou Th17 por induzir a produção, pela DC, da IL-12 ou IL-6, IL-1 β e IL-23, respectivamente.

Esclerose múltipla e distúrbios na regulação imune

Apesar de células T específicas para antígenos da mielina também serem detectadas em indivíduos saudáveis, estas apresentam um fenótipo ativado apenas no sangue periférico de pacientes com EM. Isso sugere que mecanismos de regulação imune estão deficientes em pacientes com EM (Goverman, 2011).

A regulação das respostas mediadas pelos linfócitos T efetores Th1 e Th17 é importante para evitar o desenvolvimento de doenças imunomediadas pela produção excessiva de citocinas inflamatórias (Costantino *et al.*, 2008). Sabemos, por exemplo, que respostas exacerbadas mediadas pelos linfócitos Th1 e, principalmente, Th17 estão envolvidas não apenas na gênese da EM, como também de outras doenças autoimunes (Zaghouani *et al.*, 2009). Portanto, a regulação das repostas imunes mediadas pelos linfócitos T efetores é fundamental para a manutenção da homeostase, e é principalmente exercida por um conjunto de células T reguladoras. (Vignali *et al.*, 2008)

Com base na expressão de determinados marcadores, as células T reguladoras consistem em uma população relativamente heterogênea que possui em comum algumas propriedades, tais como hiporresponsividade a estimulação antigênica e função imunossupressora (Saito *et al.*, 2007). Dentre elas se destacam as células T reguladoras do tipo 1 (Tr-1) e, mais recentemente, as células T CD4⁺ reguladoras naturais (nTregs), ambas sendo majoritariamente CD4⁺ (Aluvihare *et al.*, 2004; Saito *et al.*, 2007) (Figura 3).

As células nTregs são primariamente originárias do timo e fenotipicamente expressam grandes quantidades da cadeia α do receptor para a IL-2 (CD25) na superfície e, intracelularmente, o fator transcricional chamado FoxP3 (FoxP3, do inglês “forkhead winged helix”) (Shevach *et al.*, 2006). Adicionalmente, em humanos, essas células são positivas para os marcadores de membrana CD45RO, CD62L, GITR (receptor do TNF induzido por glicocorticoide) (Shevach *et al.*, 2006) associada à ausência do receptor para IL-7 (CD127) (Liu *et al.*, 2006). Células Treg ativadas produzem as citocinas anti-inflamatórias TGF- β (fator de crescimento transformado β), IL-10 e IL-35 (Dieckmann *et al.*, 2001) e suprimem proliferação e função das células T CD4⁺ e T CD8⁺ não só de forma parácrina, através do efeito inibitório dessas citocinas, mas principalmente através de contato, como por exemplo a inibição da apresentação de antígeno através da expressão do CTLA-4 nas Tregs. (Piccirillo;

Shevach, 2001; Grohmann *et al.*, 2002; Wing *et al.*, 2002; Fallarino *et al.*, 2003; Nakamura *et al.*, 2004; Shevach, 2009; Lee *et al.*, 2009).

Apesar de uma origem central, mais recentemente, vários artigos têm demonstrado que células do tipo nTregs-símiles podem ser obtidas a partir de linfócitos TCD4⁺CD25⁻ virgens quando ativadas na presença de TGF- β (Fantini *et al.*, 2004; Polanczyk *et al.*, 2004; Walker *et al.*, 2005; Polanczyk *et al.*, 2006; Tai *et al.*, 2008). Essas Treg induzidas (iTreg) apresentam o mesmo fenótipo das nTregs e, quando ativadas, secretam grandes quantidades de TGF- β e IL-10 (Polanczyk *et al.*, 2004; Polanczyk *et al.*, 2006; Tai *et al.*, 2008). Atualmente, alguns autores sugerem que as iTreg podem, na verdade, representar as clássicas células Th3 (Xu *et al.*, 2010).

O fenótipo Tr1 (célula T reguladora tipo 1), muitas vezes referida como célula reguladora FoxP3-negativa, conhecida em produzir níveis elevados de IL-10, é induzida na presença de IL-10 e IL-27 (Barrat *et al.*, 2002; Aluvihare *et al.*, 2004; Carpentier *et al.*, 2009). A IL-10 é uma citocina com potente ação inibidora dos mecanismos efetores da resposta imune mediada pelos fenótipos Th1 e Th17 (Groux *et al.*, 1997; Strobl; Knapp, 1999). Até o momento, não existe um marcador de superfície que identifique a célula Tr1.

No contexto da EM, enquanto alguns pesquisadores não tem identificado uma diferença significativa na frequência de células T reguladoras no sangue periférico de indivíduos saudáveis e de pacientes (Venken *et al.*, 2007; Michel *et al.*, 2008), vários estudos têm revelado, no entanto, incapacidade dessas células em inibir a proliferação e a produção de citocinas inflamatórias pelas células T efetoras específicas para proteínas da mielina (Venken *et al.*, 2007; Michel *et al.*, 2008; Falcon, 2009; Hensen *et al.*, 2008; Smolders *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2009). Essa deficiência funcional pode estar relacionada à menor expressão intracelular da proteína FoxP3 descrita nas células T reguladoras de pacientes com EM (Venken *et al.*, 2007). Ademais, durante as recaídas clínicas, linfócitos T FoxP3⁺ representam o infiltrado minoritário dentre os leucócitos no cérebro de pacientes com EM (Venken *et al.*, 2007). A menor frequência dessas células no SNC durante o surto pode indicar falha delas em migrar para as áreas de lesão devido a não expressão de adressinas específicas, reduzida sobrevivência local ou mesmo transformação dessas em células potencialmente encefalitogênicas de fenótipo Th17 (Venken *et al.*, 2007). Interessantemente, estudo por Michel *et al.* (2008) sugere que falhas funcionais das células T reguladoras em controlar a reação inflamatória em pacientes com EM seja indireta, isto é, esteja relacionada à elevada produção de citocinas

inflamatórias, tais como IFN- γ e TNF- α , produzidos por linfócitos T efetores que expressam elevados níveis de receptor para a citocina IL-7, o CD127. Nesse estudo, a depleção *in vitro* dessas células CD4⁺CD127^{hi} permitiu que os linfócitos T reguladores dos pacientes com EM fossem igualmente capazes, quando comparado a indivíduos saudáveis, de inibir resposta inflamatória mediada por células T efetoras. Esses resultados sugerem que, na verdade, deficiências nos mecanismos de regulação possam estar atrelados à elevada produção de citocinas inflamatórias durante as crises clínicas dos pacientes com EM, e não há defeitos intrínsecos nos programas genéticos de indução e manutenção dessas células T reguladoras.

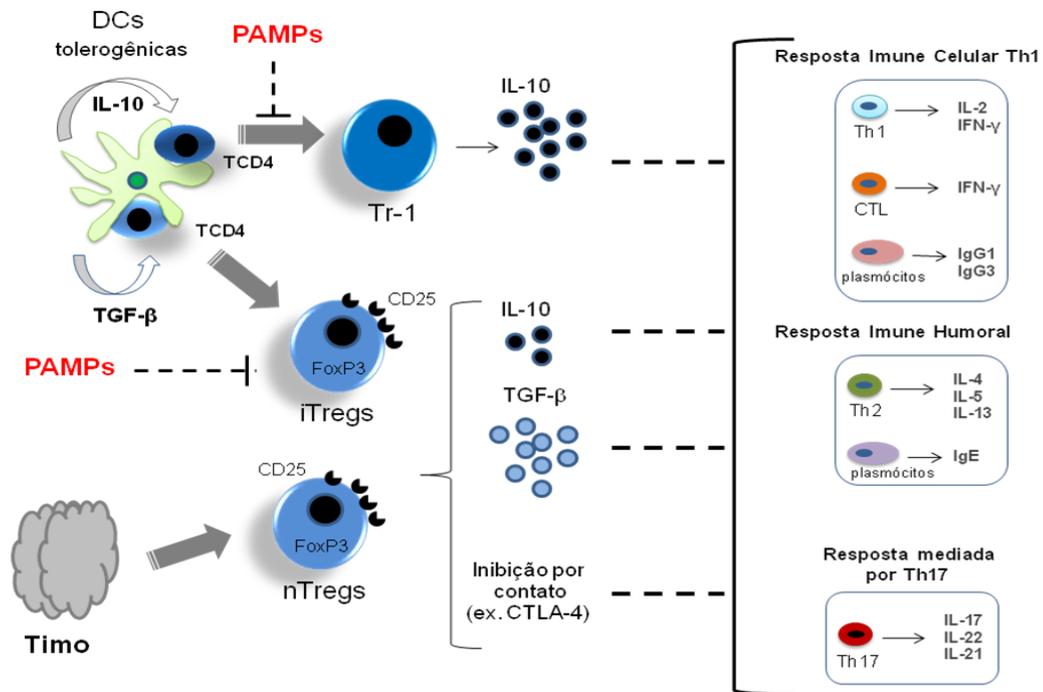


Figura 3. Regulação da resposta imune mediada pelas células T reguladoras.

A figura representa as células reguladoras Tr1, Treg induzida (iTreg) e Treg natural (nTreg), sendo a última proveniente do timo e as duas primeiras geradas periféricamente. As citocinas por elas produzidas, bem como moléculas de superfície (no caso das Tregs), exercem ação inibitória sobre os fenótipos efetores Th1, Th2 e Th17. A IL-10 e o TGF- β , por exemplo, inibem diretamente as células da imunidade inata (como fagócitos e células NK) quanto específicas (Th1, Th2 e Th17). Quanto à inibição via contato, a expressão superficial de CTLA-4 (CD152) pelas células Tregs reduz a função imunogênica das DCs por ligar-se às moléculas B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86). A linha tracejada (---) representa inibição. A figura destaca os efeitos inibidores de determinados PAMPs na indução e também na função das células T reguladoras. A maioria dos achados sugere que os efeitos adversos desses antígenos seja indireta, isto é, elevando a produção de citocinas inflamatórias, tal como IL-6.

Fatores genéticos e ambientais envolvidos no risco de desenvolvimento e/ou progressão da esclerose múltipla.

A EM é uma doença de etiologia multifatorial com influências de fatores genéticos e ambientais. Por se tratar de uma patologia de mediação imune, alguns estudos tem descrito uma forte relação entre a expressão de alguns genes envolvidos na resposta imune com maior resistência ou suscetibilidade à EM. A expressão, por exemplo, de alguns alelos do MHC (complexo principal de histocompatibilidade) de classe II, particularmente HLA (antígeno leucocitário humano)-DR β 5*0101, HLA-DR β 1*1501, HLA-DQA1*0102, HLA-DQ β 1*0602 e HLA-DR β 1*0602 tem sido associada com maior suscetibilidade à EM (Runmarker *et al.*, 1994). Essas observações estão de acordo com a hipótese que a EM seja uma doença autoimune mediada principalmente pelas células TCD4⁺, subtipo de linfócito dependente das moléculas do complexo de HLA de classe II para reconhecer antígenos próprios da bainha de mielina. Outros genes também parecem afetar o risco de desenvolver a doença, tais como o nível de expressão das moléculas STAT-3 (do inglês “signal transducer and activator of transcription 3”) (Spach *et al.*, 2009) e CD25 (Alcina *et al.*, 2009). O gene CD25 codifica a cadeia α do receptor para a citocina IL-2, uma citocina fundamental para o bom funcionamento das células T reguladoras implicadas em proteger o indivíduo de doenças autoimunes (Hall *et al.*, 2011). Deficiência na expressão desse receptor, portanto, eleva o risco à EM (Alcina *et al.*, 2009). A molécula STAT-3 funciona como um transativador de promotores para diferentes genes envolvidos na ativação imune, incluindo a via de sinalização intracelular Jak (fator de transcrição Janus quinase)-STAT que tem sido implicada na diferenciação das células TCD4⁺ no fenótipo Th17 (Qin *et al.*, 2010). Como descrito previamente, as células Th17 específicas para peptídeos das proteínas da bainha mielina têm sido relacionadas na patogênese da EM.

Interessantemente, há muito tempo os clínicos têm associado EM às doenças infecciosas causadas por bactérias e, principalmente, por vírus (Ascherio; Munger, 2007). Dentre estes, a maioria dos estudos tem revelado uma relação mais frequente entre infecção com o vírus do Epstein-Barr (EBV) e EM (Ascherio; Mente, 2000). No contexto da infecção pelo EBV, pacientes jovens adultos que desenvolvem a manifestação aguda da doença, conhecida como mononucleose infecciosa, têm maior risco em desenvolver EM (Ascherio; Mente, 2000). Estudos objetivando identificar a relação entre esses dois eventos têm sugerido

duas interessantes hipóteses: reação cruzada e quebra de tolerância. No primeiro caso, pesquisadores têm demonstrado a presença de reatividade cruzada entre células T específicas para peptídeos do EBV capazes de reconhecer também epítomos da bainha de mielina (Cepok *et al.*, 2005). Entretanto, como maior risco em desenvolver EM foi igualmente observado em indivíduos seguindo outras doenças, tais como infecções agudas por *Chlamydia pneumoniae* e o herpes vírus 6 humano (Ascherio; Munger, 2007), existe a possibilidade, não excludente, de que doenças infecciosas possam agir como um sinal, um “gatilho” para a indução da resposta autoimune, por favorecer a quebra de tolerância imune.

Doenças infecciosas e autoimunidade: papel como adjuvante.

Diferentes moléculas expressas por diferentes patógenos são poderosos adjuvantes na indução da resposta imune, e o seu principal mecanismo de ação envolve a ativação das células da imunidade inata, particularmente as células apresentadoras de antígenos, ou APCs (do inglês “antigen presenting cells”). Como mencionado previamente, a natureza das interações entre uma APC, principalmente as células dendríticas (DC), e as células T determina o perfil funcional desses linfócitos como células efetoras promotoras de inflamação do tipo Th1, Th2 ou Th17 (Reizis *et al.*, 2012). Portanto, fatores ambientais capazes de modular o status funcional das APCs pode, assim, alterar o curso de uma resposta imune adaptativa. No contexto das doenças autoimunes se destacam determinados antígenos microbianos, os chamados padrões moleculares associados a patógenos, ou PAMPs (do inglês “pathogen-associated molecular pattern”), em favorecer principalmente respostas imunes mediadas por células Th17 (Figura 2).

A habilidade do hospedeiro em se proteger contra diferentes patógenos depende da capacidade das células da resposta imune inata, em identificá-los através da expressão de diferentes receptores conhecidos como PRRs (do inglês “pattern recognition receptor”). Enquanto alguns são expressos na superfície outros são intracelulares, mas ambos têm habilidade em reconhecer diferentes PAMPs (Netea; Wijmenga; O'Neill, 2012; Abdelsadik; Trad, 2011). Esses PRRs incluem: os receptores do tipo Toll (TLR, do inglês “Toll-like receptors”) (Tabela 2); receptores do tipo Nod (NLR, do inglês “Nod-like receptors”) e as helicases do tipo RIG-1, ambos reconhecem PAMPs no citosol da célula hospedeira; e

receptores lectinas do tipo C, capazes de reconhecer polissacarídeos de diferentes patógenos (Kumar; Kawai; Akira, 2011 e 2009; Osorio; Reis; Souza, 2011; Rajan, *et al.*, 2009; Yanai *et al.*, 2009). As vias de sinalização disparadas pelo engajamento desses PRRs leva a ativação celular, e no caso da APC, amplifica sua capacidade em ativar as células T por aumentar a expressão de moléculas do complexo HLA, a produção de citocinas e de moléculas co-estimuladoras, particularmente os membros da família B7 (B7.1/CD80 e B7.2/CD86) (Kumar; Kawai; Akira, 2009; Rajan *et al.*, 2009).

Vários PAMPs microbianos, por possuírem atividade adjuvante sobre as APCs, têm sido implicados na imunopatologia das doenças autoimunes, tais como o lipopolissacarídeo (LPS) de várias bactérias gram-negativas, o peptídeoglicano, rico nas paredes de bactérias gram-positivas, a flagelina e ácidos nucleicos bacterianos e virais (Janeway Jr., 1989).

Um excelente exemplo da importância do poder adjuvante de produtos microbianos na autoimunidade é a clássica indução do modelo experimental da EM em camundongos, a EAE, através da imunização dos animais com peptídeos da proteína básica da mielina emulsificados em adjuvante completo de Freund, ou CFA (do inglês “complete Freund’s adjuvant”). O CFA contém *Mycobacterium tuberculosis* morta, e PAMPs dessa micobactéria podem ativar as respostas imunes inatas, promovendo assim a ativação das células T (Damsker; Hansen; Caspi, 2010). Esse poderoso adjuvante induz a produção de IL-12 e IL-23 pelas DCs, favorecendo assim a indução de células Th1 e Th17, respectivamente (Luger *et al.*, 2008). Ademais, *M. tuberculosis* ativa o inflamassoma NLRP3, que promove a produção de IL-1 β e IL-18 (Damsker; Hansen; Caspi, 2010; Lalor *et al.*, 2011).

PAMPs expressos na parede de outros micro-organismos parecem favorecer a quebra de tolerância e indução de EAE. Nesse contexto, Hansen e colaboradores (2006), demonstraram que imunização de camundongos com MOG (do inglês “myelin oligodendrocyte glycoprotein”) em combinação com altas doses de LPS, reconhecido pelo TLR4, induz EAE (2006). Ademais, estudos por Prinz e colaboradores (2006) e por Marta e colaboradores (2008) demonstraram que camundongos deficientes na proteína MYD88, proteína envolvida na via de sinalização da maioria dos TLRs, são resistentes à indução de EAE. Essa resistência ao desenvolvimento da doença em camundongos foi atrelada à reduzida produção de IL-6 e IL-23 pelas DCs e de IL-17 e IFN- γ pelas células T. Coletivamente, esses achados revelam a importância da sinalização via TLR na indução da EM experimental.

Em humanos, a ativação de monócitos não apenas com PAMPs de bactérias (ácido lipoteicóico), como também com LPS e zimosano (preparação de parede celular) favorece a produção de IL-17 por células T CD4⁺ humanas ativadas via TCR (Evans *et al.*, 2007). Ademais, polimorfismo genético de TLRs tem sido associado às doenças autoimunes (Park *et al.*, 2004; Hong *et al.*, 2007), e PAMPs tem sido identificados em tecidos de pacientes com desordens autoimunes, tal como no cérebro de pacientes com EM (Schrijver *et al.*, 2001). Interessantemente, nesses pacientes, elevada expressão de TLRs tem sido detectada em astrócitos e oligodendrócitos de pacientes com EM (Bsibsi *et al.*, 2002), sugerindo que elevada sinalização via TLR pode estar envolvida no etiopatogenia EM .

Finalmente, como consequência do dano inflamatório crônico ao tecido do hospedeiro, padrões moleculares associados ao dano, ou DAMPs (do inglês “damage-associated molecular pattern molecules”) podem ser expressos e, por serem reconhecidos por diferentes tipos de TLRs, podem perpetuar processos inflamatórios autoimunes, amplificando as vias envolvidas em lesão tissular (Janeway Jr., 1989). Muitos DAMPs são proteínas nucleares e citossólicas (Rubartelli; Lotze, 2007; Farkas; Kilgore; Lotze, 2007). (Tabela 2)

Além de favorecer a indução de doenças autoimunes, a presença de determinados PAMPs pode favorecer subsequentes exacerbações da autoimunidade. De fato, o uso de agonista do TLR7 e do TLR8, utilizado no tratamento de pacientes com câncer, tem sido descrito em exacerbar psoríase em pacientes (Rajan; Langtry, 2006).

Finalmente, alguns estudos têm demonstrado que muitos dos efeitos adversos de vários PAMPs na autoimunidade podem estar relacionados às suas ações sobre desenvolvimento e função das células T reguladoras (Figura 3). No contexto da autoimunidade, DCs murinas, ativadas por LPS, via TLR4, ou pelo oligodeoxinucleotídeo rico em CpG não metilado (característico de DNA bacteriano), via TLR9, produz IL-6 que inibe a função das células T reguladoras (Pasare; Medzhitov, 2003). Esse efeito foi igualmente observado quando as DCs foram ativadas via TLR7 através da ligação a RNA de vírus (Hackl *et al.*, 2011). Além de inibir a função dessas células, a produção de citocinas inflamatórias, tais como IL-1 β e IL-6, induz a expressão de ROR-C e IL-17 pelas células originalmente Treg (Hackl *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2008; Li; Kim; Boussiotis, 2010). Portanto, citocinas como IL-6 e IL-1 β parecem ser cruciais na reprogramação do perfil genético de células Tregs em direção ao fenótipo Th17 (Yang *et al.*, 2008; Li; Kim; Boussiotis, 2010). Ademais, altas concentrações de flagelina, das bactérias *Bacillus subtilis*,

Salmonella typhimurium, inibiram, via TLR5, a expressão de FoxP3 na célula Treg ativada via TCR (anti-CD3/anti-CD28) (Crellin *et al.*, 2005).

Os resultados apresentados aqui revelam, portanto, que a patogênese da autoimunidade é um fenômeno complexo com a participação de vários fatores genéticos e ambientais, particularmente aqueles associados aos patógenos. A aquisição de novos conhecimentos acerca das bases moleculares e celulares da interação entre esses diferentes eventos pode permitir aos pesquisadores desenvolver novas estratégias terapêuticas capazes de alterar o curso natural da doença.

Tabela 2. Receptores do tipo Toll (TLR) como sensores dos padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) e de sinais endógenos de perigo (DAMPs).

TLR	Localização	PAMPs	DAMPs	Agonistas sintéticos
TLR1 e TLR2	Extracelular	Bactéria: peptídeoglicano, lipoproteínas, ácido lipoteicóico, Fungo: zimosan	–	Pam3Cys
TLR2 e TLR6	Extracelular	Bactéria: lipoproteínas	Veriscan	MALP2
TLR3	Intracelular	Vírus: dsRNA	mRNA	Poli I:C
TLR4	Extracelular	Bactéria: LPS Vírus: protein de fusão do RSV Fungo: manana Protozoário: glicoinositolfosfolídeos	Ácidos graxos saturados, β -defensinas, oxLDL, amiloide- β	Derivados do Lipídio A
TLR5	Extracelular	Bactéria: flagellina	–	–
TLR7 e TLR8	Intracelular	Vírus: ssRNA	RNA próprio	Imiquimode, R-848
TLR9	Intracelular	Bactéria: CpG DNA Vírus: CpG DNA Protozoário: hemozoína	DNA próprio	CpG-ODNs
TLR11	Extracelular	Bactéria uropatogênica Protozoário: molécula profilina-símile	–	–

Receptores do tipo Toll, ou TLR (Toll-like receptors) em humanos são homólogos conservados da proteína Toll da *Drosophila melanogaster* (envolvido no desenvolvimento embrionário desses insetos). Os TLRs são expressos na superfície ou intracelularmente em muitos tipos celulares, especialmente nas células do sistema imune inato funcionando como sensores de infecção, ao reconhecer os padrões moleculares associados aos patógenos, ou PAMPs (*pathogen-associated molecular pattern*), e de dano celular, ou DAMPs (*damage-associated molecular patterns*). Abreviaturas na tabela: CpG-ODNs, oligodeoxinucleotídeos contendo a sequência CpG; dsRNA, RNA de fita dupla; LPS, lipopolissacarídeo; MALP2, lipopeptídeo 2 de micoplasma ativador de macrófagos; oxLDL, lipoproteína de baixa densidade oxidada; PoliI:C, ácido poliinosínico-policitídílico; RSV, vírus sinovial respiratório; ssRNA, RNA de fita simples.

Tratamento da esclerose múltipla

Nos pacientes com EM em surto, pulsoterapia com corticóides ajuda a controlar as crises de déficit neurológico por inibir as células do sistema imune, bloqueando assim a produção de citocinas e de outros mediadores inflamatórios envolvidos nas lesões neuronais (Lana-Peixoto *et al.*, 2002). Na remissão, no entanto, vários pacientes têm sido condicionados ao tratamento com imunomoduladores objetivando diminuir o número e a severidade dos surtos, modificando assim o curso natural da doença.

Resultados demonstrados em várias publicações de estudos multicêntricos têm comprovado o benefício do uso dos interferons (IFN)- 1β e - 1α e do acetato de glatirâmer em vários pacientes com EM. Esses imunomediadores reduzem o número de lesões ativas na ressonância nuclear magnética de crânio e o número de surtos em pacientes com EM-RR (Lu *et al.*, 2012). Os mecanismos pelos quais os IFNs reduzem substancialmente as crises clínicas e atividade da doença têm sido alvo de pesquisas de vários grupos e alguns resultados têm demonstrado que essas citocinas reduzem a frequência de células T $CD4^+$ periféricas ativadas ($CD38^+HLA-DR^+$) associado ao aumento no número de células T $CD4^+FoxP3^+$ e T $CD8^+FoxP3^+$ reguladoras (Revel *et al.*, 1995; Andrés *et al.*, 2007; Durelli *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2012). Aproximadamente um ano após iniciar o tratamento com os IFNs, a maioria dos pacientes eleva os níveis de células T reguladoras no sangue periférico e no líquido (Andrés *et al.*, 2007). Quando colocados em cultura, esses linfócitos produzem grandes quantidades de IL-10, quando comparado aos valores dosados antes do início do tratamento (Andrés *et al.*, 2007). De maneira similar, dados experimentais têm demonstrado que o acetato de glatirâmer também é capaz de elevar a frequência de células T $CD8^+$ capazes de produzir IL-10 em muitos pacientes com EM-RR (Weber; Hohlfeld; Zamvi, 2007; Lu *et al.*, 2012).

Apesar do indiscutível benefício do uso desses imunomoduladores no curso clínico da EM, a maioria dos pacientes irá desenvolver resistência terapêutica e o mecanismo envolvido por trás disso não é conhecido. Isso deve estar atrelado ao nosso pobre conhecimento acerca dos eventos imunes sequenciais envolvidos na progressão clínica da doença.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil funcional das células T e dos monócitos obtidos de pacientes com esclerose múltipla recorrente-remitente (EM-RR) na fase de remissão clínica e sua relação com o grau de incapacidade neurológica e resposta *in vitro* ao glicocorticóide.

1.2 Objetivos específicos

- Avaliar a extensão da resposta proliferativa de células T em culturas de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de pacientes com EM-RR seguindo adição do ativador policlonal fitohemaglutinina (PHA) e comparar com culturas obtidas de indivíduos saudáveis;
- Realizar uma análise comparativa do perfil de citocinas inflamatórias (relacionadas aos fenótipos Th1, Th2 e Th17) e anti-inflamatórias (típicas Tregs) nos sobrenadantes das culturas de CMSP contendo células T policlonalmente ativadas obtidas de indivíduos saudáveis e de pacientes com EM-RR;
- Avaliar o impacto do glicocorticóide na produção de citocinas em culturas de CMSP contendo células T policlonalmente ativadas obtidas de indivíduos saudáveis e de pacientes com EM-RR;
- Avaliar possível correlação entre os níveis de citocinas dosadas *in vitro* com o grau de incapacidade neurológica do paciente com EM-RR;
- Dosar a produção de citocinas definidoras dos fenótipos Th1 (IL-12) e Th17 (IL-23) em cultura de monócitos ativados com lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano nos dois grupos estudados; e
- Quantificar os níveis séricos de LPS e sua relação com o perfil de citocina dosado *in vitro* e o grau de incapacidade neurológica do paciente com EM-RR.

2 METODOLOGIA

2.1 Pacientes

Para nosso estudo, 20 pacientes com diagnóstico definitivo (segundo critérios de McDonald) de esclerose múltipla com a forma recorrente-remitente (EM-RR) na fase de remissão clínica foram recrutados a partir do serviço de Neurologia do Hospital da Lagoa (RJ), coordenado pela investigadora Prof^a Dr^a Regina Maria Papais Alvarenga, médica neurologista e professora associada de Neurologia da UNIRIO. Informações quanto idade, gênero, tempo de doença e grau de incapacidade neurológica foram obtidas a partir do prontuário do paciente. Para evitarmos a interferência de qualquer droga imunomoduladora nos ensaios funcionais estudados aqui, todos os pacientes recrutados a participar desse estudo não faziam uso de glicocorticóides há pelo menos 60 dias e não utilizavam qualquer imunoterapia, tal como o interferon ou acetato de glatirâmer. Foram excluídos pacientes que apresentassem qualquer sintoma de doença infecciosa, outra doença autoimune ou patologia crônica, ingestão de mais de 200 mL de cerveja por dia ou fossem tabagistas crônicos. Como controle da normalidade quanto ao perfil imunológico, 20 indivíduos saudáveis pareados por sexo e idade foram incluídos em nosso estudo.

Esse estudo foi aprovado pelo comitê de Ética da UNIRIO (ANEXO B) e as amostras de sangue periférico só foram colhidas após cada indivíduo ter dado sua permissão oral e por escrito (assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido – ANEXO A).

2.2 Culturas de células mononucleares do sangue e estímulo

Para o nosso estudo, aproximadamente 20 mL de sangue periférico foram colhidos utilizando agulhas e tubos estéreis contendo heparina ou em seringas heparinizadas (BD Vacutainer, Franklin Lakes, NY). Imediatamente após a coleta, o sangue foi encaminhado até o laboratório de Imunofisiologia e Imunopatologia dos Linfócitos T (LIILT). A partir da centrifugação do sangue total sobre um gradiente de densidade Fycoll-Hypaque obtivemos os plasmas e as células mononucleares (CMSP).

Enquanto os plasmas foram congelados a -20°C , as CMSP colhidas foram lavadas (3 vezes) com solução de HANK e contadas em azul de trypan à 0,4% (v/v), para exclusão de células mortas da contagem, usando uma câmara de Neubauer. Para os experimentos funcionais, a concentração de CMSP viáveis foi ajustada para $1 \times 10^6/\text{mL}$ e as células foram cultivadas em placa de 96 poços de fundo chato em 0,2 mL de meio RPMI 1640 completo ou em uma placa de 24 poços de fundo chato em 1 mL de meio RPMI 1640 completo. O meio RPMI 1640 é considerado completo após a adição de 2 mM de L-glutamina (GIBCO, Carlsbad, CA, USA), 10% de soro fetal bovino, 20 U/mL de penicilina, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomicina e 20 mM de tampão HEPES. Nos experimentos objetivando a obtenção de monócitos, $2 \times 10^6/\text{mL}$ de CMSP foram incubadas por 1 h em placas de 24 poços e as células não aderentes foram então recolhidas e as placas lavadas com 2 mL de meio RPMI completos à temperatura ambiente. Após contagem das células em suspensão, aproximadamente 8% das células permaneceram aderidas nas placas, isto é, $1,6 \times 10^5/\text{mL}$ de monócitos.

A fim de induzir a ativação policlonal das células T, todas as culturas de CMSP ($1 \times 10^6/\text{mL}$) foram mantidas por 3 dias com fitohemaglutinina (PHA, $1\mu\text{g}/\text{mL}$), tempo correspondente ao pico de resposta das células T humanas à PHA. Para ativar a monocamada de monócitos, lipopolissacarídeo (LPS) a 100 $\eta\text{g}/\text{mL}$ (*Escherichia coli* cepa 0111:B4, Invitrogen) foram adicionados e a avaliação da produção de citocinas aferida após 24 h. Finalmente, para avaliar o impacto dos glicocorticoides (utilizado no controle das crises clínicas) na resposta proliferativa e na produção de citocinas, doses farmacológicas de hidrocortisona ($1 \times 10^{-6}\text{M}$ ou $1 \times 10^{-5}\text{M}$; Sigma Chemicals, St Louis, MD) (Agarwal; Marshall, 1998) foram adicionados às culturas. Vale ressaltar que, apesar de termos usado uma solução de etanol a 1% para diluímos a solução mãe de hidrocortisona, a concentração final de etanol na cultura foi de 0,05%, dose esta que não foi capaz de alterar a viabilidade celular (dados não mostrados). Todas as culturas de células foram incubadas em uma estufa úmida a 37°C em atmosfera a 5% de CO_2 .

2.3 Ensaio de proliferação celular

Culturas de CMSP ($1 \times 10^6/\text{mL}$) foram mantidas estimuladas por 3 dias com PHA ($1\mu\text{g}/\text{mL}$) e o nível de proliferação das células T foi determinado através da incorporação do

nucleotídeo timidina tritiada ($[^3\text{H}]$ TdR, 4 $\mu\text{Ci/poço}$) adicionado às culturas 8 horas antes do término da incubação (3 dias). As células foram recolhidas, utilizando um coletor automático, e seu DNA impregnado em papel de filtro. Esses papéis foram transferidos, individualmente, para frascos contendo líquido de cintilação e levados para um contador (modelo Is 6000se da Beckman). A incorporação da timidina radioativa nas moléculas do DNA foi avaliada através desse contador de radiação β e os resultados foram mostrados como média \pm desvio padrão das contagens por minuto (cpm).

2.4 Determinação de Citocinas

A fim de se dosar o conteúdo de citocinas *in vitro*, os sobrenadantes das culturas de CMSP submetidas a diferentes condições experimentais foram analisados pela técnica ELISA usando kits BD OptEIA seguindo as instruções do protocolo fornecido pelo fabricante (BD, Pharmigen, San Diego). Brevemente, 50,0 μL dos sobrenadantes (diluídos 1:10) foram adicionados a cada poço contendo anticorpo primário anti-citocina. Após 2 horas de incubação, 100,0 μL do anticorpo secundário (previamente tratado com a enzima conjugada estreptavidina-horseradish peroxidase) foram adicionados em cada poço e adicionalmente incubados por 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, 100,0 μL de substrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) foram adicionados aos poços e a reação foi revelada após 30 minutos tendo adicionado uma solução de parada (ácido fosfórico a 1,0 M). As placas foram lidas a 450 nm em leitor de ELISA (Dynex Technologies, USA). Para o nosso estudo, nós dosamos as seguintes citocinas: IL-12p40, IL-23, IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-4, IL-5, IL-21, TNF- α , IFN- γ , TGF- β e IL-17. Citocinas humanas recombinantes variando de 7-500 pg/mL foram usadas para construir curvas-padrão.

2.5 Dosagem de LPS

A quantificação de LPS no plasma foi realizada utilizando-se um ensaio de lisado de amebócitos de *Limulus* (*Limulus Amebocyte Assay* – LAL) (Lonza, Basel, Switzerland) de acordo com as instruções do fabricante. Inicialmente os plasmas foram aquecidos a 56°C por

30 minutos e diluídos 1:5 utilizando água apirogênica fornecida pelo kit (LAL Reagent Water). 50 µL do plasma diluído foram adicionados em cada poço de uma placa de 96 poços (estéril e apirogênica). Cada dosagem foi realizada em duplicata. Em seguida, 50 µL de LAL foi adicionado a cada poço e, após 10 minutos, 100 µL/poço da solução de substrato foi adicionada. Por fim, após 6 minutos a reação foi interrompida através da adição de 100 µL de solução de parada (ácido acético a 25% v/v, em água apirogênica) em cada poço. Adicionalmente, no intuito de excluir a possível interferência da cor de cada amostra no valor da absorbância, um terceiro poço contendo 50 µL do plasma diluído (1:5) mais 150µL de LAL Reagent Water e 100µL de solução de parada foi feito. O valor da absorbância desse terceiro poço foi utilizado para subtração da média da leitura dos outros dois poços referentes a cada indivíduo aonde foi adicionado o LAL. Finalmente, a placa foi lida em leitor de ELISA (Dynerx Technologies, USA) a 405 nm. Uma curva-padrão foi preparada com a leitura de 4 concentrações diferentes e conhecidas, preparadas a partir de uma solução-mãe vinda com o kit do ensaio.

2.6 Análise estatística

Todas as análises estatísticas dos ensaios de proliferação e dosagem de citocinas foram conduzidas usando o programa de gráfico GraphPad Prism versão 5.0 para Windows (GraphPad). O teste não-paramétrico de Mann-Whitney U foi utilizado para determinar se os dois grupos eram estatisticamente diferentes para cada variável dada. O teste t de student foi utilizado para avaliar o impacto da hidrocortisona nos eventos imunes estudados. A correlação de Pearson foi aplicada para avaliar a relação entre citocinas ou as concentrações plasmáticas de LPS com o EDSS dos pacientes. A significância em todos os experimentos foi definida como $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Impacto da hidrocortisona na resposta proliferativa das células T de pacientes com EM-RR

Inicialmente, para investigar o nível de proliferação das células T, culturas de CMSP, obtidas de 20 pacientes com EM-RR (Tabela 3), foram ativadas por 3 dias com o ativador policlonal PHA na presença ou na ausência de hidrocortisona (HC), e a extensão da expansão clonal aferida pelo nível de captura de timidina tritiada ($[^3\text{H}]$ TdR). Para fins de comparação as mesmas análises foram conduzidas em culturas de CMSP obtidas de indivíduos saudáveis. Vale ressaltar que, em ambos os grupos estudados, nenhuma linfoproliferação foi detectável nas culturas de células não estimuladas, isto é, mantidas apenas na presença de meio RPMI completo (dados não mostrados). Como podemos observar na figura 4, o nível de captura de $[^3\text{H}]$ TdR foi significativamente menor nas culturas de pacientes com EM-RR quando comparado ao grupo controle ($p= 0.0433$). A hidrocortisona, apesar de ter capacidade de reduzir significativamente a expansão policlonal das células dos pacientes, este glicocorticóide foi mais eficiente em inibir esse evento nas culturas contendo células T policlionalmente ativadas obtidas de indivíduos saudáveis, isto é, o grupo controle (Figura 4).

Tabela 3. Características dos indivíduos.

	Controle ¹ (n= 20)	EM-RR ² (n= 20)
Idade em anos [média (dp)]	38,7 (14,9)	40,8 (10,3)
Homens (%)	50	35
Tempo em anos desde o diagnóstico [média (dp)]	NA ⁴	6,3 (3,7)
EDSS ³ [média (variação)]	NA	5,26 (2-7,5)

¹Indivíduos saudáveis e ²pacientes com esclerose múltipla recorrente-remitente (EM-RR) na remissão clínica. ³Expanded Disability Status Scale. ⁴Não se aplica.

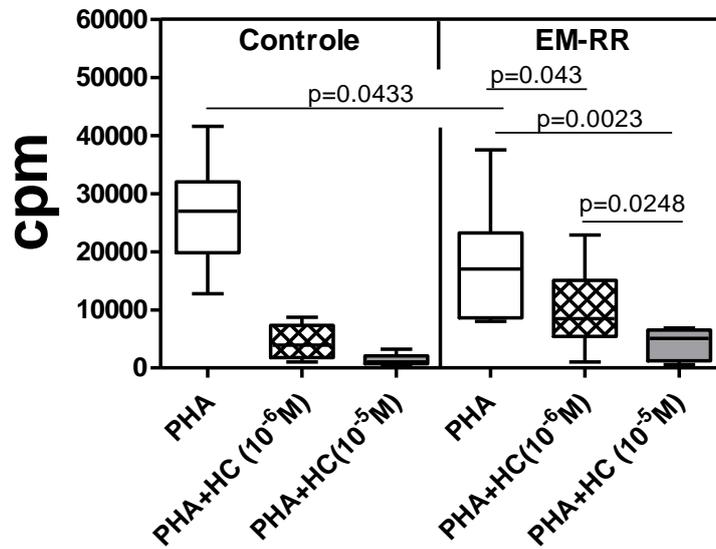


Figura 4. Resposta proliferativa das células T de pacientes com EM-RR em presença de hidrocortisona.

CMSP (1×10^6 /mL) purificadas de pacientes com esclerose múltipla recorrente-remitente (EM-RR) ($n=20$) e indivíduos saudáveis (controle, $n=20$) foram mantidas por 3 dias em cultura na presença de PHA ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$) ou PHA mais hidrocortisona (HC) em duas diferentes concentrações ($1 \times 10^{-6}\text{M}$ e $1 \times 10^{-5}\text{M}$). O índice de proliferação foi avaliado através da captura de $[^3\text{H}]$ TdR e os valores de cpm e dos p estão indicados na figura. Na figura, as linhas horizontais dentro das caixas correspondem à mediana, os limites das caixas correspondem aos percentis 25 e 75, e as linhas verticais indicam o intervalo.

3.2 Análise do perfil de citocinas em culturas de células T ativadas obtidas de pacientes com EM-RR

Como descrito na introdução, o tipo de resposta imune adquirida mediada pelas células T é principalmente determinado pelo padrão de citocinas produzidas por esses linfócitos. Portanto, nosso próximo passo foi avaliar o perfil de citocinas produzidas pelas culturas de CMSP ativadas com PHA. Mais uma vez é importante ressaltar que produção detectável de citocinas relacionadas ao fenótipo Th1 (IFN- γ), Th2 (IL-4 e IL-5) e típicas Th17 (IL-17 e IL-21) não foi detectada nas culturas de CMSP obtidas dos dois grupos experimentais quando mantidas só com meio de cultura (dados não demonstrados).

Seguindo a estimulação das culturas de CMSP com PHA, nossos resultados mostrados na Figura 5A revelaram que, com relação ao fenótipo Th1, apesar de nenhuma diferença

significativa ter sido observada nos níveis IFN- γ produzidos nos grupos estudados, a liberação de IL-2 foi significativamente inferior nas culturas obtidas dos pacientes. Com relação a produção de citocinas relacionadas ao fenótipo Th2 (IL-4 e IL-5), nenhuma diferença foi observada em resposta ao PHA nos dois grupos estudados (Figura 5B).

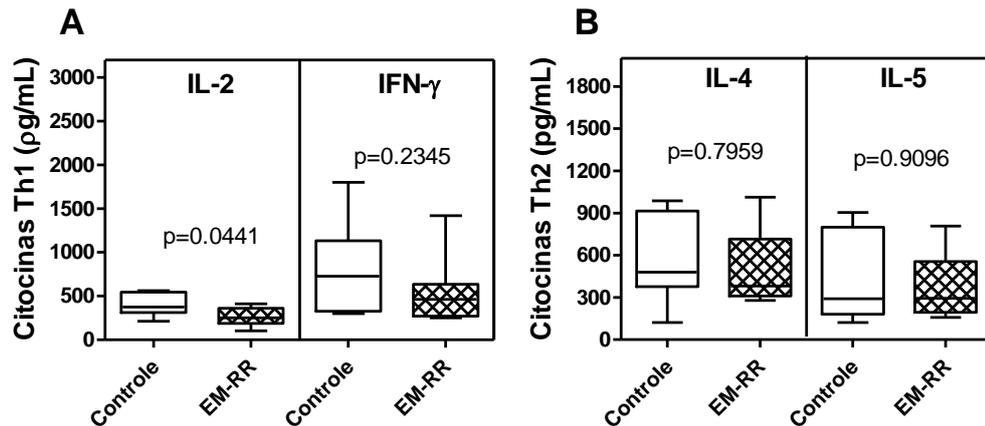


Figura 5. Análise do perfil *in vitro* de citocinas do tipo Th1/Th2 em pacientes com EM-RR.

PHA (1 μ g/ml) foi adicionada às culturas de CMSP (1x10⁶/mL) obtidas de indivíduos saudáveis (n=20) ou de pacientes com esclerose múltipla recorrente-remitente (EM-RR) (n=20) e os sobrenadantes foram recolhidos após 3 dias para determinação de diferentes citocinas através da técnica ELISA. A figura mostra a dosagem de citocinas relacionadas ao fenótipo (A) Th1 (IL-2 e IFN- γ) e (B) Th2 (IL-4 e IL-5). Na figura, as linhas horizontais dentro das caixas correspondem à mediana, os limites das caixas correspondem aos percentis 25 e 75, e as linhas verticais indicam o intervalo. Os valores de *p* estão indicados na figura.

Quando a quantificação das citocinas relacionadas ao fenótipo Th17 foi conduzida, nós observamos que a produção de TNF- α , IL-6 e IL-17 foi significativamente superior nas culturas de células de pacientes com EM-RR, quando comparado ao controle (Figura 6). Nenhuma diferença foi observada com relação à produção de IL-1 β e IL-21 em ambos os grupos estudados (Figura 6). Interessantemente, níveis detectáveis de IL-6 (37 \pm 41pg/mL) e IL-1 β (22 \pm 17 pg/mL) foram dosados nos sobrenadantes das culturas de CMSP dos pacientes com EM-RR na remissão clínica mantidos apenas na presença do meio de cultura (produção espontânea).

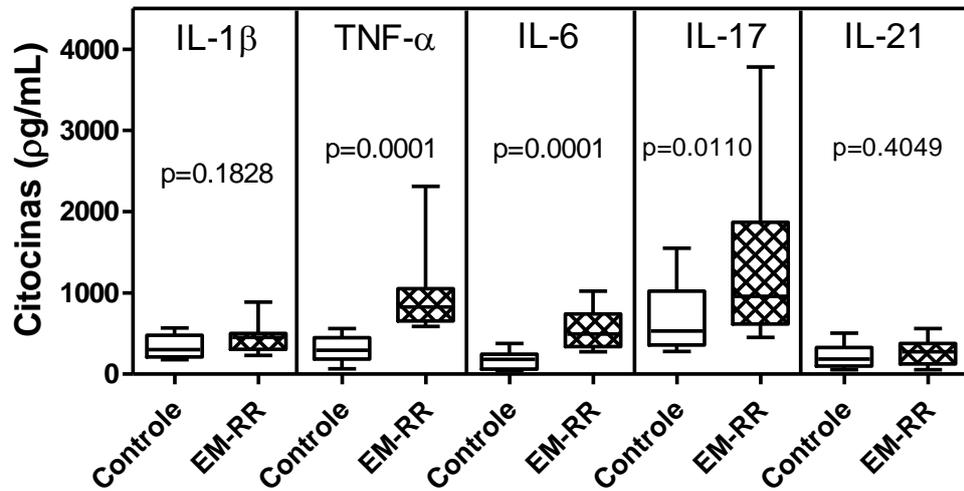


Figura 6. Produção de citocinas relacionadas ao fenótipo Th17 em culturas de células de pacientes com EM-RR.

Culturas de CMSP (1×10^6 /mL), obtidas de indivíduos controles ($n=20$) ou de pacientes com esclerose múltipla recorrente-remite (EM-RR) ($n=20$), foram ativadas por 3 dias na presença de PHA ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$) e a produção de IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-21 e IL-17 foi realizada através do ELISA. Na figura, as linhas horizontais dentro das caixas correspondem à mediana, os limites das caixas correspondem aos percentis 25 e 75, e as linhas verticais indicam o intervalo. Os valores de p estão indicados na figura.

Em geral, o desenvolvimento de doenças autoimunes tem sido atrelado a um dano nos mecanismos imunes de autotolerância, tal como deficiência na produção de citocinas anti-inflamatórias pelas células T reguladoras (Tregs) (Costantino; Baecher-Allan; Hafler, 2008). Entretanto, como demonstrado na figura 7, ao menos durante a fase de remissão clínica, os níveis de IL-10 e TGF- β nas culturas de CMSP de pacientes não foram significativamente diferentes dos valores dosados nas culturas obtidas de indivíduos saudáveis.

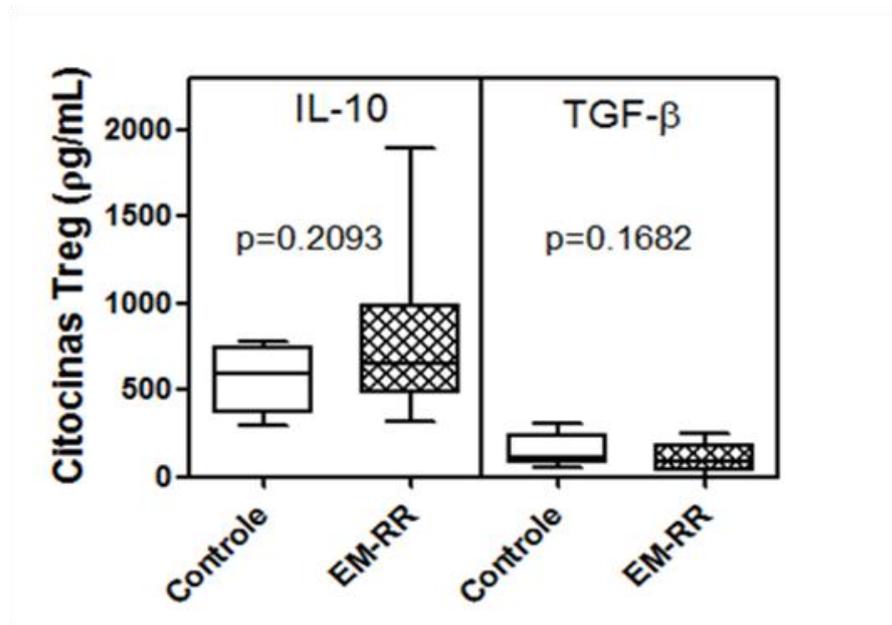


Figura 7. Análise do perfil *in vitro* de citocinas do tipo Treg em pacientes com EM-RR.

PHA (1 μ g/mL) foi adicionada às culturas de CMSP (1x10⁶/mL) obtidas de indivíduos saudáveis (n=20) ou de pacientes com esclerose múltipla recorrente-remitente (EM-RR) (n=20) e os sobrenadantes foram recolhidos após 3 dias para determinação de IL-10 e TGF- β através da técnica ELISA. Na figura, as linhas horizontais dentro das caixas correspondem à mediana, os limites das caixas correspondem aos percentis 25 e 75, e as linhas verticais indicam o intervalo. Os valores de *p* estão indicados na figura.

3.3 Correlação entre a produção *in vitro* de IL-17, incapacidade neurológica e resposta à hidrocortisona

Alguns estudos clínicos têm demonstrado níveis séricos e líquóricos elevados de IL-17 em pacientes com EM durante a fase ativa da doença (Lovett-Racke; Yang; Racke, 2011; Matusevicius *et al.*, 1999; Lock *et al.*, 2002). Em nosso estudo, uma correlação positiva foi observada entre os níveis de IL-17, dosados nas culturas contendo células T ativadas e incapacidade neurológica dos pacientes (aferidos pela pontuação do EDSS) (Figura 8).

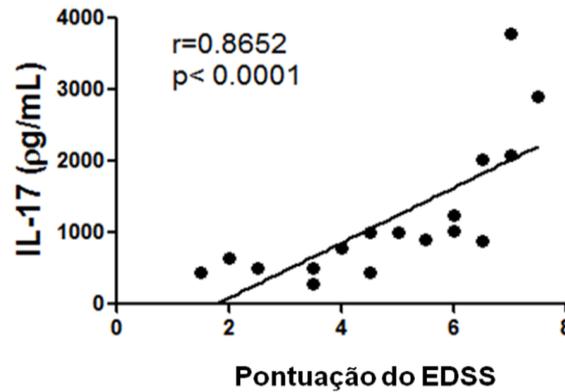


Figura 8. Correlação entre os níveis de IL-17 e a pontuação do EDSS dos pacientes com EM-RR.

A figura destaca forte correlação positiva entre os níveis de IL-17, produzidos por culturas de CMSP ($1 \times 10^6/\text{mL}$) contendo linfócitos T policlonalmente ativados, e a pontuação do EDSS (dados obtidos a partir do prontuário médico).

Durante as crises clínicas, os pacientes são tratados com pulsoterapia de corticóide. Como demonstrado na figura 4, a resposta proliferativa das células T de pacientes com EM-RR seguindo a adição da PHA foi menos sensível a adição da hidrocortisona que no grupo controle. Como a produção de IL-17 foi maior nas culturas de células de pacientes com EM, e devido a implicação dessa citocina na doença, nosso próximo objetivo foi avaliar a capacidade da HC em modular *in vitro* a produção dessa citocina. Como demonstrado na figura 9A, a HC, adicionada em duas doses diferentes, foi menos eficaz em inibir a produção de IL-17 produzida nas culturas de CMSP contendo células T policlonalmente ativadas de pacientes com EM. Ademais, a menor eficiência em inibir a IL-17 foi observada principalmente nas culturas de células de pacientes com maior incapacidade neurológica (aferido pelo valor do EDSS) (Figura 9B).

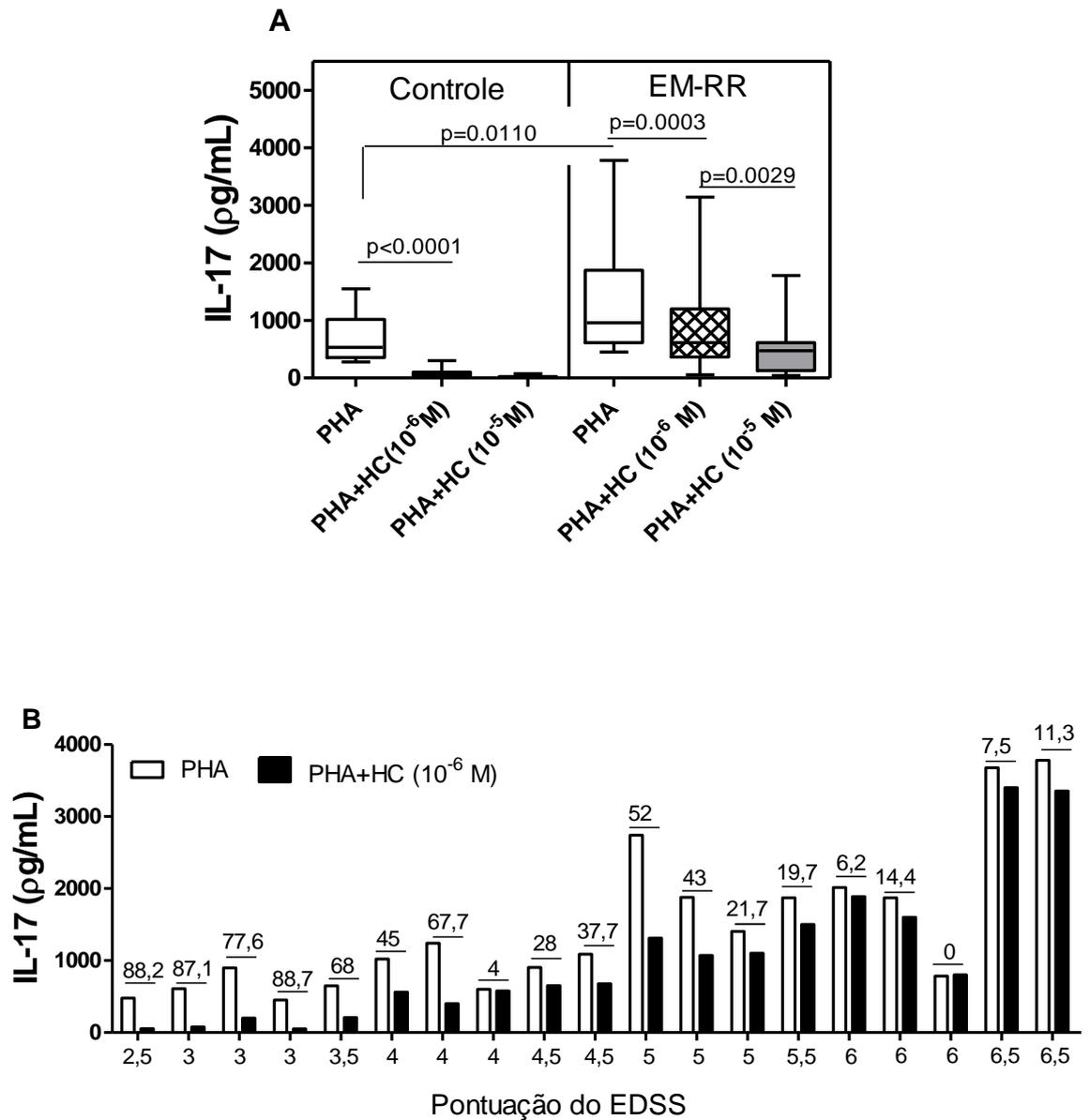


Figura 9. Efeito do glicocorticoide na produção *in vitro* de IL-17 em pacientes com EM-RR.

Em (A), CMSP (1×10^6 /mL) obtidas de indivíduos saudáveis (controle, $n=20$) ou de pacientes com esclerose múltipla recorrente-remite (EM-RR) ($n=19$) foram mantidas em cultura por 3 dias na presença de PHA ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$) com ou sem hidrocortisona (HC) em duas concentrações diferentes (1×10^{-6} M e 1×10^{-5} M) e a dosagem de IL-17 foi conduzida através da técnica ELISA. Em (B), o efeito da HC (1×10^{-6} M) sobre a produção de IL-17 foi estratificado pelo EDSS dos pacientes. Na figura B, o valor referente a porcentagem de inibição da produção de IL-17 pela HC (10^{-6} M) para cada paciente está indicado.

3.4 Dosagem das citocinas IL-12p40, IL-23 e IL-6 produzidas por monócitos de pacientes com EM-RR em resposta ao LPS

Resultados anteriores demonstraram uma maior tendência das células T de pacientes com EM-RR, mesmo na fase de remissão clínica, em montar uma resposta mais típica Th17. Esse fenômeno pode estar atrelado à capacidade das APCs desses pacientes em produzir elevadas quantidades de citocinas envolvidas na indução do programa genético de diferenciação de uma célula T *naïve* (virgem) em células produtoras de IL-17. De fato, como pode ser observado na figura 10, níveis significativamente superiores de IL-12p40, IL-23 e IL-6 foram produzidos por monócitos de pacientes com EM-RR após a estimulação com LPS por 24 h. Interessantemente, níveis baixos mas detectáveis de IL-6 (31.3 ± 16.8 pg/mL) e IL-23 (19.8 ± 14.1 pg/mL) foram quantificados apenas nas culturas de monócitos obtidas dos pacientes com EM-RR quando mantidas apenas em meio completo.

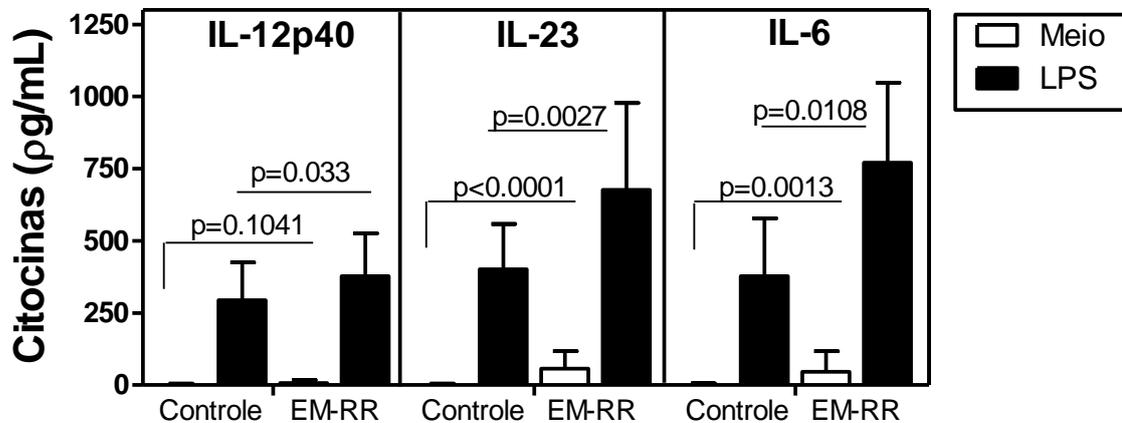


Figura 10. Produção de IL-12p40, IL-23 e IL-6 em cultura de monócitos de pacientes com EM-RR.

Culturas de monócitos (aproximadamente $1,6 \times 10^5$ /mL), obtidas de indivíduos saudáveis (controle, n=20) ou de pacientes com esclerose múltipla recorrente-remitente (EM-RR) (n=20), foram mantidas em cultura por 24 h apenas com meio ou na presença e 100 ng/mL de LPS. A produção de IL-12p40, IL-23 e IL-6 foi determinada através da técnica ELISA. A figura representa os valores médios \pm desvio-padrão e os valores de p estão indicados nos gráficos.

3.5 Quantificação dos níveis plasmáticos de LPS em pacientes com EM-RR

Diante dos resultados obtidos acima, nosso próximo e último objetivo foi determinar uma provável etiologia para maior produção de IL-23 e IL-6 nas culturas de monócitos não ativados (só com meio) dos pacientes com EM-RR. Para tanto, quantificamos os níveis plasmáticos de LPS em ambos os grupos e, como pode ser observado na figura 11A, níveis significativamente superiores de LPS foram dosados no sangue periférico dos pacientes, quando comparado ao grupo controle. Apesar de não termos observado nenhuma diferença estatística, uma clara tendência dos pacientes com maiores níveis plasmáticos de LPS em apresentarem maiores déficits neurológicos e maiores níveis de IL-17 foi observada em nosso estudo (Figura 11B e C).

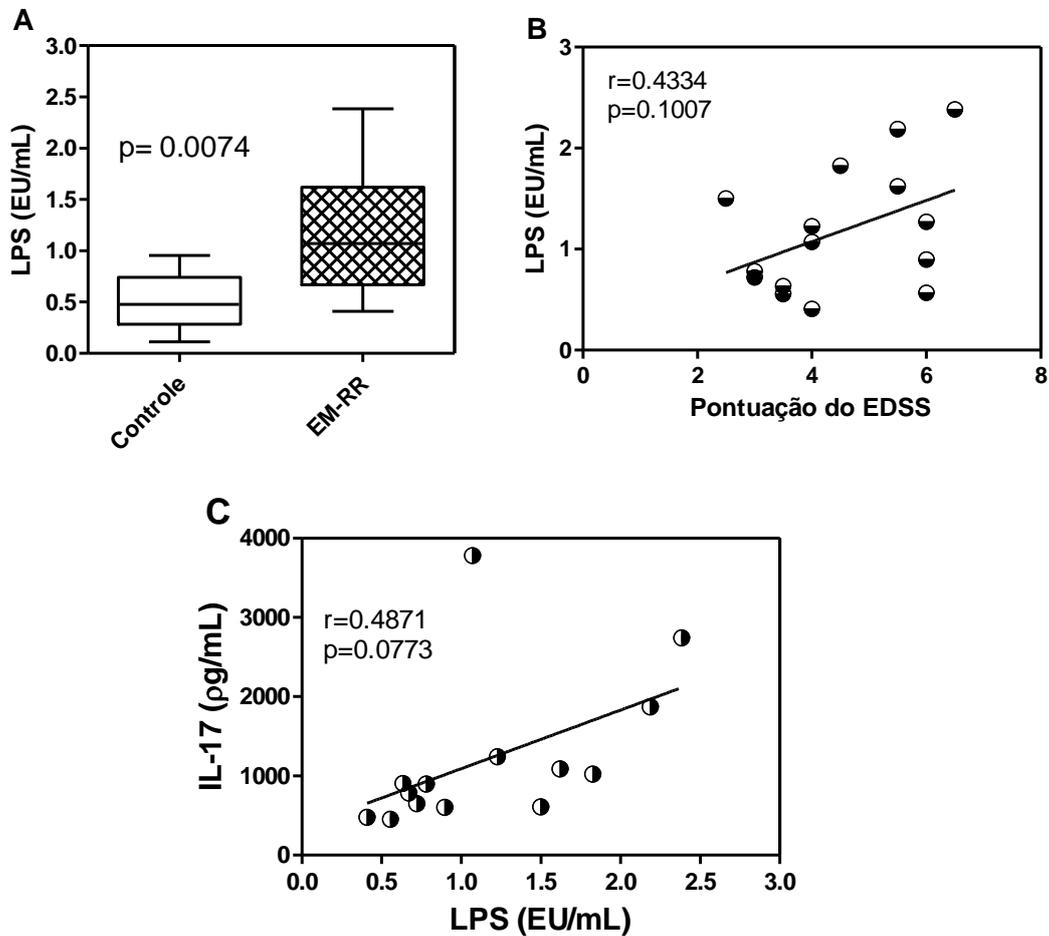


Figura 11. Quantificação dos níveis plasmáticos de LPS e sua relação com o grau de incapacidade neurológica ou nível de IL-17 produzido nos pacientes com EM-RR.

Em (A), a quantificação do LPS nos plasmas de indivíduos saudáveis de pacientes com EM-RR ($n=14$), aferida pelo ensaio quantitativo de LAL (*ver metodologia*). Em (B) temos a relação entre os níveis de LPS nos plasmas dos pacientes com EM-RR ($n=14$) e o grau de incapacidade neurológica aferido pela pontuação do EDSS (dados obtidos a partir do prontuário médico). Em (C), a relação entre os níveis de IL-17 produzida pelas CMSP dos pacientes com EM-RR ($n=14$) e os níveis plasmáticos de LPS.

4 DISCUSSÃO

A esclerose múltipla (EM) é uma doença desmielinizante do sistema nervoso central (SNC) de mediação celular com domínio do fenótipo Th17 cujos alvos são peptídeos das proteínas do oligodendrócito, célula formadora da bainha de mielina (Lovett-Racke; Yang; Rocke, 2011). Apesar de apresentar diferentes cursos, a forma recorrente-remitente (RR) é o curso clínico mais comum da EM. Como outras doenças autoimunes, a patogênese da EM envolve a combinação de diferentes fatores genéticos e ambientais (Selmi *et al.*, 2012) que deve favorecer não apenas o início da doença como também o risco de recaídas. No presente estudo nós observamos que mesmo na remissão clínica, os linfócitos T de pacientes com EM-RR produzem níveis elevados de citocinas relacionadas ao fenótipo Th17. Interessantemente, essa maior tendência em produzir citocinas relacionadas a células Th17 foi diretamente relacionada à síntese de IL-23 e IL-6 por monócitos ativados em cultura com lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*.

O primeiro evento imunofuncional avaliado em nosso estudo foi a capacidade proliferativa das células T em resposta ao PHA, um poderoso mitógeno de células T humanas. Nesse sentido, nossos resultados demonstraram que o nível de captura de timidina foi significativamente inferior nas culturas de células de pacientes com EM-RR quando comparado ao grupo controle, isto é, indivíduos saudáveis. Esse resultado pode ser explicado, ao menos em parte, pela menor produção de IL-2 detectadas nessas culturas. Similar prejuízo na proliferação das células T dependente de IL-2 foi observado em estudos prévios conduzidos em pacientes com EM-RR (Merril *et al.*, 1984; Killestein *et al.*, 2002) e em pacientes com neuromielite óptica recorrente-remitente (NMO-RR) (Linhares *et al.*, 2012). A NMO-RR é outra doença desmielinizante de fundo autoimune do SNC que foi por muitas décadas considerada uma variante da EM (Argyrou; Makris, 2008). Diferente da EM, a NMO se manifesta a partir do ataque imune à bainha de mielina dos nervos ópticos e da medula espinhal, caracterizado, clinicamente, por dois eventos índices, neurite óptica (NO) e mielite transversa aguda (MTA) (Wingerchuk *et al.*, 2006; Pittock *et al.*, 2006). Outra possibilidade, não excludente e não avaliada no presente estudo se refere a possibilidade de maior sensibilidade dessas células a morte induzida por ativação envolvendo vias de morte celular, tal como a via Fas (CD95). Interessantemente, apesar da menor resposta proliferativa das

células T ao ativador policlonal nos pacientes com EM-RR, maior resistência à inibição pela hidrocortisona foi observada.

Os glicocorticóides (GCs) endógenos, particularmente o cortisol, estão sob o controle do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e executa um papel importante em regular processos inflamatórios (Franchimont, 2004). Os GCs podem suprimir a produção de citocinas inflamatórias por inibirem a atividade do fator de transcrição nuclear chamado de fator nuclear da cadeia kappa da célula B (NF κ B, do inglês “nuclear factor κ B”) (De Bosscher *et al.*, 2000). Elevada atividade do eixo HPA tem sido observada em pacientes com EM e parece estar negativamente associado com o nível de inflamação aguda (Michelson *et al.*, 1994). Entretanto, apesar de GCs exógenos serem frequentemente utilizados no tratamento das recaídas clínicas dos pacientes com EM, a resposta a esses fármacos difere entre os pacientes, sugerindo diferenças na sensibilidade aos GCs (Gold *et al.*, 2012). Acredita-se que, após longos períodos de ativação elevada do eixo HPA, resistência central e periférica aos glicocorticóides surjam, primariamente devido a uma redução tanto na expressão quanto na sensibilidade dos receptores para os GC (Phillips *et al.*, 1998). Essa resistência ao GC compromete a regulação das respostas inflamatórias pelo eixo HPA, levando a um estado basal de elevada ativação imune (De Kloet *et al.*, 2007; Gotovac *et al.*, 2003). Nesse sentido, estudo por Roel e colaboradores (2004) demonstrou que concentrações superiores de dexametasona foram necessárias para reduzir em 50% os níveis de IL-6 produzidos por CMSP de pacientes com EM ativadas com LPS quando comparado ao grupo controle, isto é, indivíduos saudáveis. O mesmo fenômeno foi observado com relação a eficiência do GC em inibir a produção de TNF- α em culturas de monócitos de pacientes com EM-RR ativados com LPS (van Winsen *et al.*, 2005). Nesse último estudo, essa maior resistência ao GC não foi corrigida após uso de imunoterapia com IFN- β . Finalmente, trabalho por Correale e colaboradores (2000) demonstrou que clones de células T específicas para o antígeno PLP (proteolípídeo) de pacientes com EM com a forma progressiva secundária são mais resistente à apoptose *in vitro* por GC. Coletivamente, esses resultados denunciam a existência de resistência periférica e central ao GC como mais um fator de risco para a progressão da doença e menor eficácia terapêutica com metilpredinisona, um glicocorticóide sintético utilizado no controle das crises clínicas de déficit neurológico.

O tipo de resposta imune mediada pelas células T é principalmente determinado pelo padrão de citocinas produzido por esses linfócitos. Nesse sentido, na presença de elevadas

concentrações de IL-12 ou de IL-4, as DCs humanas induzem a diferenciação das células T, ativadas via TCR, em Th1 ou Th2, respectivamente (Fazileau *et al.*, 2007; Henrickson; von Adrian, 2007). Células Th1 produzem grandes quantidades de IFN- γ e IL-2, e realizam a chamada resposta imune celular, por ativar fagócitos, células assassinas naturais (células NK, do inglês “natural killer”) e os linfócitos T CD8⁺. O IFN- γ não apenas aumenta o poder microbicida dos fagócitos (neutrófilos e macrófagos), a função lítica das células NK, como também induz linfócitos B humanos a produzir IgG1 e IgG3 (McKinstry *et al.*, 2010). A resposta imune celular é fundamental para o combate a micro-organismos que causem infecções intracelulares (obrigatórios ou facultativos). Por outro lado, células Th2 medeiam resposta imune humoral através da secreção de IL-4, IL-5 e IL-13 permitindo assim a ativação dos linfócitos B e produção de IgE (Zhu *et al.*, 2010). A resposta dos linfócitos Th2 está envolvida no combate às infestações por helmintos e na patogênese das reações de hipersensibilidade do tipo I (Makani *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2010). Em nosso estudo, apesar da produção de IL-2 ter sido inferior nas culturas de CMSP ativadas com PHA do grupo de pacientes, nenhuma diferença significativa na liberação de IFN- γ (Th1) e das citocinas relacionadas ao fenótipo Th2 (IL-4 e IL-5) foi observada em resposta ao PHA nos dois grupos estudados.

No contexto da EM, estudos em modelos experimentais e evidências clínicas apontam para um envolvimento maior das células Th17 na imunopatologia das lesões cerebrais (Lovett-Racke; Yang; Rojce, 2011). Em humanos, a diferenciação das células T CD4⁺ em Th17 é induzida pela produção de níveis elevados de IL-1 β e a IL-23 pelas DCs maduras (Gutcher; Becher, 2007). As células Th17 produzem IL-17A (chamada de IL-17), IL-17F, IL-21, TNF- α e IL-1 β , que dentre muitas funções destaca-se a capacidade de induzir as células imunes e parenquimatosas a secretar IL-8, principal quimiocina envolvida no recrutamento de neutrófilos para a área de infecção (Miossec, 2009). Apesar da resposta imune mediada por células Th17 ser importante no combate às bactérias extracelulares e fungos (Matsuzaki; Umemura, 2007), sua descrição original como uma nova linhagem de células T CD4⁺ foi descrita no contexto da autoimunidade, particularmente no modelo experimental de EM (Miossec, 2009). Em acordo com os dados da literatura, em nosso presente estudo um domínio na produção de citocinas relacionadas ao fenótipo Th17 (IL-17, IL-6 e TNF- α) não apenas foi detectado nas culturas de células dos pacientes com EM-RR na remissão clínica, como os níveis de IL-17 foram diretamente correlacionados com o grau de incapacidade

neurológica do paciente. Interessantemente, a produção de IL-1 β e IL-6 foi detectada nessas culturas sem adição de qualquer estímulo exógeno. O mesmo foi observado com relação a liberação de IL-6 e IL-23 em culturas de monócitos mantidos na presença apenas de meio de cultura. Acreditamos que estes fenômenos devam estar relacionados à sensibilização dos monócitos *in vivo* pelo LPS circulante, que, como observado em nosso estudo, foi significativamente superior nos plasmas dos pacientes com EM-RR, quando comparado aos níveis dosados no grupo controle.

Sabe-se que a regulação da resposta imune mediada pelas células Th17 é requerida para evitar desordens imunes, tais como doenças autoimunes (Costantino; Bacher-Allan; Hafler, 2008). Em geral, o desenvolvimento de doenças autoimunes tem sido atrelado a um dano nos mecanismos imunes de autotolerância, tal como deficiência na produção de citocinas anti-inflamatórias pelas células T reguladoras (Tregs) (Costantino; Baecher-Allan; Hafler, 2008). Nesse sentido, a produção de IL-10 e TGF- β pelas células T reguladoras inibem tanto a expressão de moléculas co-estimuladoras e secreção de citocinas inflamatórias pelas DCs, como agem diretamente sobre os linfócitos T ativados suprimindo a proliferação e atenuando as suas funções efetoras (Groux *et al.*, 1997; Barrat *et al.*, 2002; Groux, 2003; Wood ; Sakaguchi, 2003). No contexto da EM, vários estudos têm revelado incapacidade das células T reguladoras em inibir a proliferação e a produção de citocinas inflamatórias pelas células T efetoras específicas para proteínas da mielina (Venken *et al.*, 2007; Michel *et al.*, 2008; Falcon, 2009; Hensen *et al.*, 2008; Smolders *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2009). Em nosso estudo, no entanto, nenhuma diferença foi observada na produção dessas citocinas pelas culturas de células de ambos os grupos estudados. Entretanto, não podemos descartar a possibilidade de que, durante as crises clínicas, deficiências na função das células T reguladoras surjam como mecanismos adicionais de desregulação imune. Ainda vale ressaltar que, apesar de não termos observado nenhuma diferença quanto a produção de IL-10 e TGF- β em nossos pacientes, acreditamos que essas citocinas não conseguem controlar a produção elevada de citocinas inflamatórias do tipo Th17. Em nossa opinião um evento que vale a pena ser investigado num futuro próximo é quantificar os níveis de expressão do receptor para essas citocinas anti-inflamatórias na superfície das células T desses pacientes, que podem estar significativamente reduzidos. De qualquer maneira, desregulação em nível hormonal documentada aqui deve exercer um efeito adverso no curso da doença. Em nosso estudo, uma maior resistência aos efeitos inibidores do glicocorticóide sobre a produção *in vitro* de IL-17 foi observada nas

culturas de células contendo linfócitos T policlionalmente ativados de pacientes com EM-RR, particularmente dentre aqueles com incapacidades neurológicas mais severas. Sabendo que nos pacientes com EM em surto, pulsoterapia com corticóides é utilizada para ajudar no controle das recaídas (Lana-Peixoto *et al.*, 2002), esse resultado deve ter implicações diretas sobre a eficácia do tratamento da doença.

Finalmente, em nosso estudo uma maior tendência em montar uma resposta mais típica Th17 foi atrelada a maior produção de IL-23 e IL-6 por monócitos ativados com LPS. Interessantemente, como mencionado acima, níveis detectáveis de IL-23 e IL-6 foram observados apenas nas culturas de monócitos obtidas dos pacientes com EM-RR quando mantidas na presença só de meio de cultura. Em nosso estudo, esse fenômeno pode ser explicado pela ativação persistente, e de baixa extensão, dos monócitos circulantes pelo LPS, detectado em níveis maiores no plasma dos pacientes com EM-RR. Pacientes com níveis maiores de LPS circulantes tendenciam a produzir *in vitro* mais IL-17 e em possuem incapacidades neurológicas mais severas. Acreditamos que a ausência de significância nessas relações entre os níveis de LPS circulantes pode estar relacionada a dois eventos não excludentes: número pequeno de amostras colhidas e à sensibilidade diferenciada entre os indivíduos a esse PAMP devido às variações alélicas de TLRs. Polimorfismo genético de TLRs tem sido associado às doenças autoimunes (Park *et al.*, 2004; Hong *et al.*, 2007). Fenômeno similar foi descrito em pacientes com NMO-RR (Barros *et al.*, manuscrito submetido à revista *Journal of Clinical Immunology*). Interessantemente, em uma de nossas pacientes com diagnóstico de NMO-RR acompanhada pelo nosso grupo, recaída de mielite foi observada logo após aumento sérico de LPS. Apesar desse fenômeno ter sido observado ao acaso, pela coleta de sangue periférico desse paciente, esse dado é muito interessante e pode ser avaliado em nossos pacientes com EM-RR a partir da coleta de sangue dos pacientes com EM-RR antes, durante e após recaída clínica. Esses resultados sugerem que maior translocação bacteriana pode ser um importante fator de risco para deflagração de uma nova crise de déficit neurológico por, provavelmente, favorecer a ativação de clones de células T de memória dirigidos contra diferentes antígenos da bainha de mielina.

Evidências clínicas, e mais claramente resultados obtidos em modelos experimentais, revelam a forte ligação existente entre infecção e doenças autoimunes. Essa relação tem sido atribuída tanto a mecanismos envolvendo semelhança molecular entre antígenos derivados dos patógenos com moléculas próprias do hospedeiro (Kivity *et al.*, 2009; Guillerme; Kalil;

Cunningham, 2006; Fujinami *et al.*, 2006; Abu-Shakra *et al.*, 1999; Asherson; Shoenfeld, 2000; Agmon-Levin *et al.*, 2009; Blank *et al.*, 2007; Blank *et al.*, 2002; Gharavi *et al.*, 2002; Basu *et al.*, 2000; Bachmaier *et al.*, 1999; Steinhoff *et al.*, 1999), bem como consequência da ativação inespecífica da resposta imune inata favorecendo os mecanismos de quebra de tolerância imunológica no compartimento das células T e B (Damsker; Hansen; Caspi, 2010; Selmi *et al.*, 2012). Esses mecanismos não são excludentes, portanto, semelhança molecular pode disparar a ativação inicial das células T autorreativas virgens e/ou expansão de uma população de células T de memória, enquanto produtos microbianos capazes de ativar resposta imune inata podem contribuir na reativação das células T de memória, contribuindo assim para as recaídas subsequentes, característica da maioria das doenças autoimunes (Selmi *et al.*, 2012). Diferentes agentes infecciosos (vírus, bactérias e fungos), ou seus produtos, podem exacerbar e/ou servir como gatilhos das reações de autoimunidade (Selmi *et al.*, 2012). Nesse sentido, nós acreditamos que o LPS detectado em níveis superiores no sangue dos pacientes com EM-RR possa executar um papel importante como adjuvante na doença por induzir as APCs a secretarem níveis elevados de IL-23, IL-6 e IL-1 β . De fato, estudos têm demonstrado que alguns PAMPS, tais como LPS, flagelina e ácido lipoteicoico, favorecem a indução de uma resposta Th17 pelas células T CD4⁺ humanas ativadas via receptor da células T, ou TCR (do inglês “T cell receptor”) (Gaddis; Michalek; Katz, 2011; Jin *et al.*, 2012). Esse evento foi descrito como dependente da produção de IL-23 e IL-1 β pelas DCs em resposta a esses PAMPs. Estudos *in vivo* tem adicionalmente demonstrado que macrófagos, astrócitos e oligodendrócitos do cérebro de pacientes com EM expressam níveis elevados de TLR e que PAMPs bacterianos têm sido detectados nessa região (Schrijver *et al.*, 2001; Bsibi *et al.*, 2002), sugerindo um envolvimento da sinalização da via TLR na patogênese da EM (Bsibi *et al.*, 2002). Ademais, apesar da falta de estudo, vale lembrar que ligantes endógenos, os DAMPs, podem ser gerados como produtos da resposta inflamatória crônica no qual o paciente com EM é condicionado, podendo assim contribuir na perpetuação das reações de lesão no SNC por se ligarem aos TLRs. Finalmente, apesar de classicamente o modelo experimental de EM em camundongo, a chamada EAE, ser induzida através da imunização do animal com antígenos da mielina emulsificados no adjuvante de Freud, a doença pode também ser induzida através da imunização do animal com MOG na presença de elevadas doses de LPS (Hansen *et al.*, 2006). Esses resultados sugerem que APCs, como monócitos,

ativadas por produtos microbianos, como o LPS, podem executar um papel importante em contribuir para o domínio de uma resposta Th17 em pacientes com EM.

Apesar de TLRs serem tipicamente expressos pelas células da imunidade inata, tais como macrófagos e DCs, células T CD4⁺ e T CD8⁺ ativadas via TCR passam a expressar TLR (Babu *et al.*, 2006; Gururajan *et al.*, 2007; Pietschmann *et al.*, 2009; Zarembek; Godowski, 2002). Os efeitos adversos dos PAMPs na autoimunidade podem, portanto, estar também relacionados às ações diretas dessas moléculas nas células T humanas. Nesse contexto, linfócitos T CD8⁺ encontrados nas lesões cerebrais de pacientes com EM-RR expressam elevados níveis de TLR (Wong *et al.*, 2010; Hornung *et al.*, 2002). Recente estudo por Mansson, Mikael e Cardell (2006) demonstrou que dentre as células T ativadas, os níveis de TLR4 são maiores no compartimento CD8⁺.

Em humanos, a presença sistêmica de PAMPs tem sido relacionada à maior translocação microbiana, particularmente em nível intestinal. Classicamente, o nível de translocação bacteriana pode ser aferido indiretamente pela dosagem periférica de LPS (Balzan *et al.*, 2007). Alguns estudos em humanos têm revelado alguns efeitos deletérios da translocação bacteriana em doenças humanas. Um exemplo interessante é o impacto desse fenômeno na progressão clínica da doença causada pela infecção pelo vírus da imunodeficiência humana do tipo 1 (HIV-1, do inglês “human immunodeficiency virus 1”). A infecção pelo HIV-1 danifica as barreiras imunológicas e físicas da mucosa intestinal permitindo assim maior passagem de bactérias, ou seus antígenos, para circulação periférica (Nazli *et al.*, 2010). Nesses indivíduos, níveis elevados de LPS têm sido correlacionados com maior perda das células T CD4⁺ e carga viral plasmática mais elevada (Nowroozalizadeh *et al.*, 2010; Trøseid *et al.*, 2010). Acredita-se que a presença de níveis elevados de LPS no sangue periférico do paciente infectado pelo HIV-1 mantenha as células do sistema imune inato ativadas e capazes de produzir citocinas inflamatórias, tais como IL-1 β e TNF- α , que favorecem intensa replicação viral nas células T CD4⁺ infectadas (Nowroozalizadeh *et al.*, 2010; Trøseid *et al.*, 2010). Outro estudo mais recente documentou níveis elevados de LPS em pacientes com diagnóstico de autismo (Sydney *et al.*, 2012). Interessantemente, nesse estudo, o tratamento dos pacientes com penicilina, cefalosporina e clindamicina atenuou os sintomas da doença (Sydney *et al.*, 2012).

Em nosso estudo, a elevada concentração de LPS no sangue periférico dos pacientes com EM-RR levanta uma questão interessante sobre a origem dessa maior translocação

microbiana. Uma possível explicação pode estar relacionada, ao menos em parte, ao maior grau de estresse no qual esses pacientes são condicionados, tais como quadros de ansiedade e/ou depressão (Beiske *et al.*, 2008). Durante os episódios de estresse, níveis elevados do hormônio liberador de corticotropina são produzidos no hipotálamo e este é capaz de induzir a liberação sistêmica de cortisol e noradrenalina por ativar indiretamente as glândulas adrenais e o sistema nervoso simpático (SNS) (Padgett; Glaser, 2003). Acredita-se que as catecolaminas, como a adrenalina, possam aumentar a translocação bacteriana em nível intestinal por induzir a liberação da histamina e da prostaglandina E2 pelos mastócitos da mucosa (Chang *et al.*, 2008). A histamina, por exemplo, aumenta a permeabilidade paracelular da mucosa intestinal por reduzir a expressão de moléculas de adesão célula-célula (Chang *et al.*, 2008). Sabendo-se que elevada atividade do eixo HPA tem sido identificada em pacientes com EM (Merril *et al.*, 1984; Killestein *et al.*, 2002), a ligação entre o estresse e autoimunidade, classicamente conhecida (Stojanovich; Marisavljevich, 2008), pode estar relacionada ao aumento da permeabilidade da mucosa intestinal e, conseqüentemente, maior translocação microbiana.

Finalmente, apesar da provável contribuição da *Escherichia coli* intestinal, a real origem bacteriana do LPS dosado em nosso estudo não foi avaliada. Adicionalmente, outros PAMPs bacterianos devem estar elevados no sangue periférico dos pacientes com EM-RR. Nosso próximo objetivo será estudar o impacto de diferentes PAMPs na resposta das células T CD4⁺ e T CD8⁺ em resposta *in vitro* a antígenos da bainha mielina através da citometria de fluxo. Adicionalmente, iremos realizar uma análise da expressão de diferentes TLRs nessas subpopulações de células T de pacientes com EM-RR.

5 CONCLUSÕES

- Uma menor resposta proliferativa induzida por PHA foi observada nas culturas de células T de pacientes com EM-RR quando comparadas às culturas de células T de indivíduos saudáveis.
- A resposta proliferativa das células T ao ativador policlonal PHA foi significativamente inferior nas culturas de células mononucleares (CMSP) de pacientes com EM-RR, quando comparado a indivíduos saudáveis, e isso deve estar relacionado, ao menos em parte, a menor produção de IL-2 por essas células.
- Apesar das células T de pacientes com EM-RR proliferarem menos em resposta ao PHA, a adição de HC foi mais eficiente em reduzir a expansão policlonal das células T de indivíduos saudáveis, quando comparadas às células T de pacientes com EM-RR.
- Com relação às citocinas do tipo Th1, o IFN- γ , e do tipo Th2 (IL-4 e IL-5) nenhuma diferença foi observada entre os grupos estudados. O mesmo foi observado quanto a produção das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β , secretadas particularmente por células T reguladoras.
- No que diz respeito às citocinas características do fenótipo Th17, níveis superiores de TNF- α , IL-6 e IL-17 foram produzidos pelas culturas de células dos pacientes com EM-RR, quando comparada ao grupo controle.
- Uma correlação positiva entre os níveis de IL-17 e a incapacidade neurológica dosada pelo EDSS, foi observada no grupo dos pacientes com EM-RR.
- Houve uma maior produção de IL-12p40, IL-23 e IL-6 por monócitos ativados com LPS de pacientes com EM-RR quando comparados ao grupo de indivíduos saudáveis.
- Níveis maiores de LPS foram encontrados no plasma de pacientes com EM-RR quando comparado ao grupo controle, e uma tendência foi observada entre os níveis plasmáticos de LPS e os níveis de IL-17 e o grau de incapacidade neurológica dos pacientes.
- Em conjunto, esses resultados, apesar de preliminares, revelam um domínio do fenótipo Th17 em pacientes com EM mesmo na remissão clínica. Ademais, essa maior tendência em montar uma resposta mais típica Th17 se mostrou mais refratária a inibição pelo glicocorticóide e pode também estar relacionada a maior sensibilização das células apresentadoras *in vivo* a antígenos microbianos decorrentes da maior translocação bacteriana intestinal.

REFERÊNCIAS

Abdelsadik A, Trad A. Toll-like receptors on the fork roads between innate and adaptive immunity. *Hum Immunol*. 2011; 72(12):1188-93.

Abu-Shakra M, Buskila D, Shoenfeld Y. Molecular mimicry between host and pathogen: examples from parasites and implication. *Immunol Lett*. 1999; 67:147–152.

Adams RD, Victor M. Multiple sclerosis and allied demyelinating diseases. In: *Principles of Neurology*. 1989; 4:755-774.

Agarwal SK, Marshall GD. Glucocorticoid-induced type 1/type 2 cytokine alterations in humans: a model for stress-related immune dysfunction. *J Interferon Cytokine Res*. 1998; 18:1059-1068.

Agmon-Levin N, Blank M, Paz Z, Shoenfeld Y. Molecular mimicry in systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2009; 18:1181–1185.

Alcina A, Fedetz M, Ndagire D, Fernández O, Leyva L, Guerrero M, Abad-Grau MM, Arnal C, Delgado C, Lucas, M, Izquierdo G, Matesanz F. IL2RA/CD25 Gene Polymorphisms: Uneven Association with Multiple Sclerosis (MS) and Type 1 Diabetes (T1D). *PLoS One*. 2009; 4(1): e4137.

Almolda B, Gonzalez B, Castellano B. Antigen presentation in EAE: role of microglia, macrophages and dendritic cells. *Front Biosci*. 2011; 16:1157-71.

Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat. Immunol*. 2004; 5:266–271.

Ando DG, Clayton J, Kono D, Urban JL, Sercarz EE. Encephalitogenic T cells in the B10.PL model of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) are of the Th-1 lymphokine subtype. *Cell. Immunol*. 1989 Nov; 124(1):132–143.

Andrés C, Aristimuño C, de las Heras V, Martínez-Ginés ML, Bartolomé M, Arroyo R, Navarro J, Giménez-Roldán S, Fernández-Cruz E, Sánchez-Ramón S. Interferon beta-1a therapy enhances CD4⁺ regulatory T-cell function: An *ex vivo* and *in vitro* longitudinal study in relapsing–remitting multiplesclerosis. *J Neuroimmunol*. 2007; 182:204–211.

Argyriou AA, Makris. Neuromyelitis optica: a distinct demyelinating disease of the central nervous system. *Acta Neurol Scand*. 2008; 118:209-217.

Ascherio A, Mette M. Epstein-Barr Virus and Multiple Sclerosis. *Epidemiol*. 11 2000; 11:220-224.

Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: The role of infection. *Ann Neurol*. 2007; 61:288–299.

Asherson RA, Shoenfeld Y. The role of infection in the pathogenesis of catastrophic antiphospholipid syndrome: molecular mimicry? *J Rheumatol*. 2000; 27:12–14.

Babu S, Blauvelt CP, Kumaraswami V, Nutman TB. Cutting edge: diminished T cell TLR expression and function modulates the immune response in human filarial infection. *J Immunol*. 2006; 176:3885–3889.

Bachmaier K, Neu N, de la Maza LM, Pal S, Hessel A, Penninger JM. Chlamydia infections and heart disease linked through antigenic mimicry. *Science*. 1999; 283(5406):1335–1339.

Bakshi R, Shaikh ZA, Miletich RS, Czarnecki D, Dmochowski J, Henschel K, Janardhan V, Dubey N, Kinkel PR. Fatigue in multiple sclerosis and its relationship to depression and neurologic disability. *Mult Scler*. 2000; 6:181–185.

Balzan S, Quadros CA, Cleva R, Zilberstein B, Ceconello I. Bacterial translocation: Overview of mechanisms and clinical impact. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007; 22:464–471.

Barrat FJ, Cua DJ, Bronstra A. *In vitro* generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J Exp Med*. 2002; 195:603–616.

Basu D, Horvath S, Matsumoto I, Fremont DH, Allen PM. Molecular basis for recognition of an arthritic peptide and a foreign epitope on distinct MHC molecules by a single TCR. *J Immunol*. 2000; 164:5788–5796.

Becher B, Durell BG, Noelle RJ. Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukin-12. *J Clin Invest*. 2002; 110:493–49.

Beiske AG, Svensson E, Sandanger I, Czujko B, Pedersen ED, Aarseth JH, Myhr KM. Depression and anxiety amongst multiple sclerosis patients. *Eur J Neurol*. 2008; 15(3):239–45.

Bergashi R, Romani V, Versino M. Clinical aspects of fatigue in multiple sclerosis. *Funct Neurol*. 1997; 12:247–251.

Bjartmar C, Wujek JR, Trapp BD. Axonal loss in the pathology of MS: consequences for understanding the progressive phase of the disease. *J Neurol Sci*. 2003; 206:165–171.

Blank M, Barzilai O, Shoenfeld Y. Molecular mimicry and auto-immunity. *Clin Rev Allergy Immunol* 2007; 32:111–118.

Blank M, Krause I, Fridkin M, Keller N, Kopolovic J, Goldberg I, Tobar A, Shoenfeld Y. Bacterial induction of autoantibodies to beta2-glycoprotein-I accounts for the infectious etiology of antiphospholipid syndrome. *J Clin Invest* 2002; 109:797–804.

- Brucklacher-Waldert V, Sturmer K, Kolster M, Wollhausen J, Tolosa E. Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. *Brain*. 2009; 132:3329–3341.
- Bsibsi M, Ravid R, Gveric D, van Noort JM. Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2002; 61:1013–1021.
- Carpentier A, Conti F, Stenard F, Aoudiehane L, Miroux C, Podevin P, Morales O, Chouzenoux S, Scatton O, Groux H, Auriault C, Calmus Y, Pancre V, Delhem N. Increased expression of regulatory Tr1 cells in recurrent hepatitis C after liver transplantation. *Am J Transplant*. 2009; 9(9):2102-2112.
- Cepok S, Zhou D, Srivastava R, Nessler S, Bussow K, Sommer N, Hemmer B. Identification of Epstein-Barr virus proteins as putative targets of the immune response in multiple sclerosis. *J Clin Invest*. 2005; 115:1352–1360.
- Chang L. The Role of Stress on Physiological Responses and Clinical Symptoms in Irritable Bowel Syndrome. *Curr Mol Med*. 2008; 8(4): 299–312.
- Chu CQ, Wittmer S, Dalton DK. Failure to suppress the expansion of the activated CD4 T cell population in interferon gamma-deficient mice leads to exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*. 2000; 192:123–128.
- Colosimo C, Millefiorini E, Grasso MG, Vinci F, Fiorelli M, Koudriavtseva T, Pozzilli C. Fatigue in MS is associated with specific clinical features. *Acta Neurol Scand*. 1995; 92:353-355.
- Coquerelle C, Moser M. DC subsets in positive and negative regulation of immunity. *Immunol Rev*. 2010; 234:317-324.
- Correale J, Gilmore W, Li S, Walsh J, Bassani MM, Lund B, Arias M, Weiner LP. Resistance to glucocorticoid-induced apoptosis in PLP peptide-specific T cell clones from patients with progressive MS. *J Neuroimmunol*. 2000; 109:197–210.
- Correale J, Ysraelit MC, Gaitán MI. Immunomodulatory effects of Vitamin D in multiple sclerosis. *Brain*. 2009; 132:1146–1160.
- Costantino CM, Baecher-Allan CM, Hafler DA. Human regulatory T cells and autoimmunity. *Eur J Immunol*. 2008; 38:921–924.
- Crellin NK, Garcia RV, Hadisfar O, Allan SE, Steiner TS, Levings MK. Human CD4+ T cells express TLR5 and its ligand flagellin enhances the suppressive capacity and expression of FOXP3 in CD4+CD25+ T regulatory cells. *J Immunol*. 2005; 175:8051–8059.
- Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, Lucian L, To W, Kwan S, Churakova T, Zurawski S, Wiekowski M, Lira SA, Gorman D, Kastelein RA, Sedgwick JD. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*. 2003; 421:744–748.

- Dalgas U, Stenager E, Jakobsen J, Petersen T, Hansen HJ, Knudsen C, Overgaard K, Ingemann-Hansen T. Fatigue, mood and quality of life improve in MS patients after progressive resistance training. *Mult Scler*. 2010; 16:480-490.
- Damsker JM, Hansen AM, Caspi RR. Th1 and Th17 cells: Adversaries and collaborators. *Ann N Y Acad Sci*. 2010; 1183:211–221.
- Dandekar S, George MD, Baumler AJ. Th17 cells, HIV and the gut mucosal barrier. *Curr Opin HIV AIDS*. 2010; 5(2):173-8.
- De Bosscher K, Vanden Berghe W, Vermeulen L, Plaisance S, Boon E, Haegeman G. Glucocorticoids repress NF-kappaB driven genes by disturbing the interaction of p65 with the basal transcription machinery, irrespective of coactivator levels in the cell. *Proc Natl Acad Sci*. 2000; 97(8):3919–3924.
- De Kloet CS, Vermetten E, Bikker A, Meulman E, Geuze E, Kavelaars A, Westenberg HG, Heijnen CJ. Leukocyte glucocorticoid receptor expression and immunoregulation in veterans with and without post-traumatic stress disorder. *Mol Psych*. 2007; 12:443-453.
- Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+) CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med*. 2001; 193:1303–1310.
- Durelli L, Conti L, Clerico M, Boselli D, Contessa G, Ripellino P, Ferrero B, Eid P, Novelli F. T-helper 17 cells expand in multiple sclerosis and are inhibited by interferon-beta. *Ann Neurol*. 2009; 65:499–509.
- Evans HG, Suddason T, Jackson I, Taams LS, Lord GM. Optimal induction of T helper 17 cells in humans requires T cell receptor ligation in the context of Toll-like receptor-activated monocytes. *Proc Natl Acad Sci*. 2007; 104:17034–17039.
- Falcon S. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat Rev Immunol*. 2009; 9:407.
- Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Vacca C, Bianchi R, Belladonna ML, Fioretti MC, Alegre ML, Puccetti P. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003; 4:1206–1212.
- Fantini MC, Becker C, Monteleone G, Pallone F, Galle PR, Neurath MF. Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol*. 2004; 172:5149–5153.
- Farkas AM, Kilgore TM, Lotze MT. Detecting DNA: getting and begetting cancer. *Curr Opin Investig Drugs*. 2007; 8(12):981–986.
- Fazileau N, Mcheyzer-Williams LJ, Mcheyzer-Williams MG. Local development of effector and memory T helper cells. *Cur Opin Immunol*. 2007;19:259-67.

Ferber IA, Brock S, Taylor-Edwards C, Ridgway W, Dinisco C, Steinman L, Dalton D, Fathman CG. Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Immunol.* 1996; 156:5–7.

Franchimont D. Overview of the actions of glucocorticoids on the immune response: a good model to characterize new pathways of immunosuppression for new treatment strategies. *Ann N Y Acad Sci.* 2004; 1024:124-37.

Fujinami RS, von Herrath MG, Christen U, Whitton JL. Molecular mimicry, bystander activation, or viral persistence: infections and autoimmune disease. *Clin Microbiol Rev.* 2006; 19:80–94.

Gaddis DE, Michalek SM, Katz J. TLR4 signaling via MyD88 and TRIF differentially shape the CD4+ T cell response to *Porphyromonas gingivalis* hemagglutinin B. *J Immunol.* 2011; 186(10):5772–5783, 2011.

Gareau MG, Silva MA, Perdue MH. Pathophysiological mechanisms of stress-induced intestinal damage. *Curr Mol Med.* 2008; 8(4):274-281.

Gharavi AE, Pierangeli SS, Espinola RG, Liu X, Colden-Stanfield M, Harris EN. Antiphospholipid antibodies induced in mice by immunization with a cytomegalovirus-derived peptide cause thrombosis and activation of endothelial cells in vivo. *Arthritis Rheum.* 2002; 46:545–552.

Gold SM, Sasidhar MV, Lagishetty V, Spence RD, Umeda E, Ziehn MO, Krieger T, Schulz KH, Heesen C, Hewison M, Voskuhl RR. Dynamic development of glucocorticoid resistance during autoimmune neuroinflammation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012; 97(8):E1402-10.

Golzari Z, Shabhiz F, Soudi S, Kordi MR, Hashemi SM. Combined exercise training reduces IFN- γ and IL-17 levels in the plasma and the supernatant of peripheral blood mononuclear cells in women with multiple sclerosis. *Inter Immunopharm.* 2010; 10:1415–1419.

Gotovac K, Sabioncello A, Rabatic S, Berki T, Dejaris D. Flow cytometric determination of glucocorticoid receptor (GCR) expression in lymphocyte subpopulations: Lower quantity of GCR in individuals with post-traumatic stress disorder (PTSD). *Clin Exp Immunol.* 2003; 131:335–339.

Goverman JM. Immune tolerance in multiple sclerosis. *Immunol Rev.* 2011; 241(1):228-240.

Grohmann U, Orabona C, Fallarino F, Vacca C, Calcinaro F, Falorni A, Candeloro P, Belladonna ML, Bianchi R, Fioretti MC, Puccetti P. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat Immunol.* 2002; 3:1097–1101.

Groux H. Type 1 T-regulatory cells: their role in the control of immune responses. *Transplantation.* 2003; 75:8S-12S.

- Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG. A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*. 1997; 389:737–742.
- Guilherme L, Kalil J, Cunningham M. Molecular mimicry in the autoimmune pathogenesis of rheumatic heart disease. *Autoimmunity* 2006; 39:31–39.
- Gururajan M, Jacob J, Pulendran B. Toll-like receptor expression and responsiveness of distinct murine splenic and mucosal B-cell subsets. *Plos One*. 2007; 2:e863.
- Gutcher I, Becher B. APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation. *J Clin Invest*. 2007; 117:1119-27.
- Hackl D, Loschko J, Sparwasser T, Reindl W, Krug AB. Activation of dendritic cells via TLR7 reduces Foxp3 expression and suppressive function in induced Tregs. *Eur J Immunol*. 2011; 41(5):1334–1343.
- Haegert DG, Swift FV, Benedikz J. Evidence for a complex role of HLA class II genotypes in susceptibility to multiple sclerosis in Iceland. *Neurology*. 1996; 46:1107-1111.
- Hall BM, Verma ND, Tran GT, Hodgkinson SJ. Distinct regulatory CD4⁺T cell subsets; differences between naïve and antigen specific T regulatory cells. *Curr Opin Immunol*. 2011; 23(5):641-647.
- Hansen BS, Hussain RZ, Lovett-Racke AE, Thomas JA, Racke MK. Multiple Toll-like receptor agonists act as potent adjuvants in the induction of autoimmunity. *J Neuroimmunol*. 2006; 172:94–103.
- Henrickson SE, von Adrian UH. Single-cell dynamics of T-cell priming. *Cur Opin Immunol*. 2007; 19:249-258.
- Hensen J-L, Venken P, Hellings N, Broekmans T, Hensen K, Rummens JL, Stinissen P. Recovery of Memory Treg Homeostasis during Disturbed in Multiple Sclerosis Patients: T Cell (Treg) Development and Function Are Natural Naive CD4⁺CD25⁺CD127^{low} Regulatory. *J Immunol*. 2008; 180:6411-6420.
- Hong J, Leung E, Fraser AG, Merriman TR, Vishnu P, Krissansen GW. TLR2, TLR4 and TLR9 polymorphisms and Crohn's disease in a New Zealand Caucasian cohort. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007; 22:1760–1766.
- Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdorfer B, Giese T, Endres S, Hartmann G. Quantitative expression of Toll-like receptor 1–10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol*. 2002;168:4531–4537.
- Ishizu T, Osoegawa M, Mei F-J, Kikuchi H, Tanaka M, Takakura Y, Minohara M, Murai H, Mihara F, Taniwaki T, Kira J. Intrathecal activation of the IL-17/IL-8 axis in optico-spinal multiple sclerosis. *Brain*. 2005; 128:988–1002.

Janeway Jr. CA. Immunogenicity signals 1,2,3 ... and 0. *Immunol Today*. 1989; 10(9): 283–286.

Janeway Jr. CA. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1989; 54(1):1–13.

Jin B, Sun T, Yu XH, Yang YX, Yeo AE. The Effects of TLR Activation on T-Cell Development and Differentiation. *Clin Dev Immunol*. 2012; 2012:836485.

Kebir H, Ifergan I, Alvarez JI, Bernard M, Poirier J, Arbour N, Duquette P, Prat A. Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2009; 66:390–402.

Killestein J, Hintzen RQ, Uitdehaag BM, Baars PA, Roos MT, van Lier RA, Polman CH. Baseline T cell reactivity in multiple sclerosis is correlated to efficacy of interferon-beta. *J Neuroimmunol*. 2002; 133:217-224.

Kira J-I. Neuromyelitis optica and opticospinal multiple sclerosis: mechanisms and pathogenesis. *Pathophysiology*. 2011; 18:69-79.

Kivity S, Agmon-Levin N, Blank M, Shoenfeld Y. Infections and autoimmunity: friends or foes? *Trends Immunol*. 2009; 30:409–414.

Krupp LB. Fatigue in multiple sclerosis: definition, pathophysiology and treatment. *CNS Drugs*. 2003; 17:225-234.

Krupp LB, Larocca NC, Muir-Nash J. The fatigue severity scale: application to patients with multiples esclerosis and systemic lupus erythematosus. *Arch Neurol*. 1989; 46:1121-1123.

Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol*. 2011; 30(1):16–34.

Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 388(4): 621–625.

Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*. 1983; 33:1444–1452.

Lalor SJ, Dungan LS, Sutton CE, Basdeo SA, Fletcher JM, Mills KH. Caspase-1-processed cytokines IL-1 β and IL-18 promote IL-17 production by $\gamma\delta$ and CD4 T cells that mediate autoimmunity. *J Immunol*. 2011; 186:5738–5748.

Lana-Peixoto MA, Callegaro D, Moreira MA, Campos GB, Marchiori EM, Gabbai AA, Bacheschi LA, Arruda WO, da Gama PD, Melo AS, da Rocha FCG, Lino AMM, Ferreira MLB, Ataíde Jr. L. Consenso expandido do BCTRIMS para o tratamento da esclerose múltipla. III. Diretrizes baseadas em evidências e recomendações. *Arq Neuropsiquiatr*. 2002; 60:881-886.

- Langrish CL, Chen Y, Blumenschein M, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med*. 2005; 201:233–240.
- Lanzavecchia A. C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat Immunol*. 2009;10:514–523.
- Lee CC, Lin SJ, Cheng PL, Kuo ML. The regulatory function of umbilical cord blood CD4(+) CD25(+) T cell stimulated with anti-CD3/anti-CD28 and exogenous IL-2 or IL-15. *Pediatr Allergy Immunol*. 2009; 20: 624–663.
- Levings MK, Sangregorio R, Roncarolo MG. Human CD25(+) CD4(+) T regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J Exp Med*. 2001; 193:1295–1302.
- Li L, Kim J, Boussiotis VA. IL-1 β -mediated signals preferentially drive conversion of regulatory T cells but not conventional T cells into IL-17-producing cells, *J Immunol*. 2010; 185(7):4148–4153.
- Linhares UC, Schiavoni PB, Barros PO, Kasahara TM, Teixeira B, Ferreira TB, Alvarenga R, Hygino J, Vieira MM, Bittencourt VC, Andrade RM, Andrade AF, Bento CA. The ex vivo production of IL-6 and IL-21 by CD4⁺ T cells is directly associated with neurological disability in neuromyelitis optica patients. *J Clin Immunol*. 2012 Sep 5. [Epub ahead of print].
- Liu W, Putnam AL, Xu-yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Fazekas de St Groth B, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JA. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *J Exp Med*. 2006; 203:1701–1711.
- Lock C, Hermans G, Pedotti R, Brendolan A, Schadt E, Garren H, Langer-Gould A, Strober S, Cannella B, Allard J., Klonowski P, Austin A, Lad N, Kaminski N, Galli SJ, Oksenberg JR, Raine CS, Heller R, Steinman L. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med*. 2002; 8:500–508.
- Lovett-Racke AE, Yang Y, Racke MK. Th1 versus Th17: Are T cell cytokines relevant in multiple sclerosis? *Bioch Bioph Acta*. 2011; 1812:246–251.
- Lu E, Wang BW, Guimond C, Synnes A, Sadovnick D, Tremlett H. Disease-modifying drugs for multiple sclerosis in pregnancy: a systematic review. *Neurology*. 2012; 79 (11):1130–1135.
- Lublin FD, Knobler RL, Kalman B, Goldhaber M, Marini J, Perrault M, D’Imperio C, Joseph J, Alkan SS, Korngold R. Monoclonal anti-gamma interferon antibodies enhance experimental allergic encephalomyelitis. *Autoimmunity*. 1993; 16:267–274.
- Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassaman H. Heterogeneity of Multiple Sclerosis Lesions: Implications for the Pathogenesis of Demyelination. *Ann Neurol*. 2000; 47:707–717.

Luger D, Silver PB, Tang J, Cua D, Chen Z, Iwakura Y, Bowman EP, Sgambellone NM, Chan CC, Caspi RR. Either a Th17 or a Th1 effector response can drive autoimmunity: conditions of disease induction affect dominant effector category. *J Exp Med*. 2008; 205:799–810.

Ma A, Xiong Z, Hu Y, Qi S, Song L, Dun H, Zhang L, Lou D, Yang P, Zhao Z, Wang X, Zhang D, Daloz P, Chen H. Dysfunction of IL-10-producing type 1 regulatory T cells and CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in a mimic model of human multiple sclerosis in Cynomolgus monkeys. *Intern Immunopharmacol*. 2009; 9:599-608.

Mahnke K, Enk AH. Dendritic cells: key cells for the induction of regulatory T cells? *Cur Topics Microbiol Immunol*. 2005; 293:133–150.

Makani SS, Jen KY, Finn PW. New Costimulatory Families: Signaling Lymphocytic Activation Molecule in Adaptive Allergic Responses. *Cur Mol Med*. 2008; 8:359-364.

Mansson A, Mikael Adner M, Cardell LO. Toll-like receptors in cellular subsets of human tonsil T cells: altered expression during recurrent tonsillitis. *Respir Res*. 2006; 7:36-45.

Marta M, Andersson A, Isaksson M, Kampe O, Lobell A. Unexpected regulatory roles of TLR4 and TLR9 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol*. 2008; 38:565–575.

Matsuzaki G, Umemura M. IL-17 as an effector molecule of innate and acquired immunity against infections. *Microbiol Immunol*. 2007; 51:1139-1147.

Matusевичius D, Kivisakk P, He B, Kostulas N, Ozenci V, Fredrikson S, Link H. Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 1999; 5:101–104.

Mcculligh R, Fitzgerald AP, Murphy RP, Cooke G. Long-term benefits of exercising on quality of life and fatigue in multiple sclerosis patients with mild disability: a pilot study. *Clin Rehabil*. 2008; 22:206-214.

McKinstry KK, Strutt TM, Swain SL. The potential of CD4 T-cell memory. *Immunology*. 2010; 130:1-9.

Merrill JE, Mohlstrom C, Uittenbogaart C, Kermaniarab V, Ellison GW, Myers LW. Response to and production of interleukin 2 by peripheral blood and cerebrospinal fluid lymphocytes of patients with multiple sclerosis. *J Immunol*. 1984; 133:1931-1937.

Michel L, Berthelot L, Pettré S, Wiertlewski S, Lefrère F, Braudeau C, Brouard S, Soullillou JP, Laplaud DA. Patients with relapsing-remitting multiple sclerosis have normal Treg function when cells expressing IL receptor α -chain are excluded from the analysis. *J Clin Invest*. 2008; 118:3411-3419.

Michelson D, Stone L, Galliven E, Magiakou MA, Chrousos GC, Sternberg EM, Gold PW. Multiple sclerosis is associated with alterations in hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994; 79:848-853.

- Mihara M, Hashizume M, Yoshida H, Suzuki M, Shiina M. IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)*. 2012; 122:143-159.
- Miossec P. IL-17 and Th17 cells in human inflammatory diseases. *Microb Infect*. 2009; 11:625-630.
- Munger KL, Zhang SM, O'Reilly E, Hernán MA, Olek MJ, Willett WC, Ascherio A. Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. *Neurology*. 2004; 62:60-65.
- Nakamura K, Kitani A, Fuss I, Pedersen A, Harada N, Nawata H, Strober W. TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice. *J Immunol*. 2004; 172:834-842.
- Nazli A, Chan O, Dobson-Belaire WN, Ouellet M, Tremblay MJ, Gray-Owen SD, Arsenault AL, Kaushic C. Exposure to HIV-1 directly impairs mucosal epithelial barrier integrity allowing microbial translocation. *PLoS Pathog*. 2010; 6(4):e1000852.
- Netea MG, Wijmenga C, O'Neill LA. Genetic variation in Toll-like receptors and disease susceptibility. *Nat Immunol*. 2012; 13(6):535-542.
- Nowroozalizadeh S, Mansson F, da Silva Z, Repits J, Dabo B, Pereira C, Biague A, Albert J, Nielsen J, Aaby P, Fenyö EM, Norrgren H, Holmgren B, Jansson M. Microbial translocation correlates with the severity of both HIV-1 and HIV-2 infections. *J Infect Dis*. 2010; 201(8):1150-1154.
- Obar JJ, Lefrançois L. Memory CD8+ T cell differentiation. *Ann NY Acad Sci*. 2010; 1183:251-266.
- Okuda Y, Sakoda S, Bernard C.C., Fujimura H, Saeki Y, Kishimoto T, Yanagihara T. IL-6-deficient mice are resistant to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis provoked by myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Int Immunol*. 1998; 10:703-708.
- Osorio F., Reis e Sousa C., Myeloid C-type lectin receptors in pathogen recognition and host defense. *Immunity*. 2011; 34(5): 651-664.
- Padgett DA, Glaser R. How stress influences the immune response. *Trends in Immunology*, 2003; 24: 444-448.
- Park Y, Park S, Yoo E, Kim D, Shin H. Association of the polymorphism for Toll-like receptor 2 with type 1 diabetes susceptibility. *Ann NY Acad Sci*. 2004; 1037:170-174.
- Pasare C, Medzhitov R. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* 2003; 299(5609):1033-1036.
- Penna G, Giarratana N, Amuchastegui S, Mariani R, Daniel KC, Adorini L. Manipulating dendritic cells to induce regulatory T cells. *Microb Infec*. 2005; 7:1033-1039.

- Piccirillo CA, Shevach EM. Cutting edge: Control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *J Immunol.* 2001; 167:1137–1140.
- Pietschmann K, Beetz S, Welte S, Martens I, Gruen J, Oberg HH, Wesch D, Kabelitz D. Toll-like receptor expression and function in subsets of human gammadelta T lymphocytes. *Scand J Immunol.* 2009; 70:245-255.
- Pittock SJ, Weinshenker BG, Lucchinetti CF, Wingerchuk DM, Corboy JR, Lennon VA. Neuromyelitis optica brain lesions at sites of high aquaporin 4 expression. *Arch Neur.* 2006; 63:964-968.
- Phillips DIW, Barker DJP, Fall CHD, Seckl JR, Whorwood CB, Wood PJ, Walker BR. Elevated Plasma Cortisol Concentrations: A Link between Low Birth Weight and the Insulin Resistance Syndrome? *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1998; 83: 757-760.
- Polanczyk MB, Carson D, Subramanian S, Afentoulis M, Vandenbark AA, Ziegler SF, Offner H. Cutting edge: estrogen drives expansion of the CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell compartment. *J Immunol.* 2004; 173:2227–2230.
- Polanczyk M, Hopke C, Vandenbark AA, Offner H. Estrogen mediated immunomodulation involves reduced activation of effector T cells, potentiation of Treg cells, and enhanced expression of the PD-1 costimulatory pathway. *J Neurosci Res.* 2006; 284:370–378.
- Poser S, Poser W. Multiple sclerosis and gestation. *Neurol.* 1983; 33:1422-1427.
- Prinz M, Garbe F, Schmidt H, Mildner A, Gutcher I, Wolter K, Piesche R, Weiss E, Kirschning CJ, Rochford CD, Bruck W, Becher B. Innate immunity mediated by TLR9 modulates pathogenicity in an animal model of multiple sclerosis. *J Clin Invest.* 2006; 116:456–464.
- Qin X, Guo BT, Wan B, Fang L, Lu L, Wu L, Zang YQ, Zhang JZ. Regulation of Th1 and Th17 cell differentiation and amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis by natural product compound berberine. *J Immunol.* 2010; 185(3):1855-63.
- Rajan N, Langtry JA. Generalized exacerbation of psoriasis associated with imiquimod cream treatment of superficial basal cell carcinomas. *Clin Exp Dermatol.* 2006; 31:140–141.
- Ranjan P, Bowzard JB, Schwerzmann JW, Jeisy-Scott V, Fujita T, Sambhara S. Cytoplasmic nucleic acid sensors in antiviral immunity. *Trends Mol Med.* 2009; 15(8):359–368.
- Reizis B. Classical dendritic cells as a unique immune cell lineage. *J Exp Med.* 2012; 209(6):1053-1056.
- Revel M, Chebath J, Mangelus M, Harroch S, Moviglia GA. Antagonism of interferon beta on interferon gamma: inhibition of signal transduction in vitro and reduction of serum levels in multiple sclerosis patients. *Mult Scler.* 1995; 1(Suppl 1):S5–S11.

- Roel HD, Eskandari F, Stenberg EM. Corticosteroid resistance in a subpopulation of multiple sclerosis patients as measured by ex vivo dexamethasone inhibition of LPS induced IL-6 production. *J Neuroimmunol.* 2004; 151:180-188.
- Romagnani S. Th1/Th2 cells. *Inflamm Bowel Dis.* 1999; 5(4):285-294.
- Roncarolo MG, Bacchetta R, Bordignon C, Narula S, Levings MK. Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev.* 2001; 182:68–79.
- Rubartelli A, Lotze MT. Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends Immunol.* 2007; 28(10):429–436.
- Runmarker B, Martinsson T, Wahlström J, Andersen O. HLA and prognosis in multiple sclerosis. *J Neurol.* 1994; 241:385-390.
- Sabapathy NM, Minahan CL, Turner GT, Broadley SA. Comparing endurance- and resistance-exercise training in people with multiple sclerosis: a randomized pilot study. *Clin Rehabil.* 2010; [S.I.].
- Saito S, Shima A, Nakashima A, Shiozaki A, Ito M, Sasaki Y. What is the role of regulatory T cells in the success of implantation and early pregnancy? *J Assist Reprod Genet.* 2007; 24:379–386.
- Schrijver IA, van Meurs M, Melief MJ, Wim Ang C, Buljevac D, Ravid R Hazenberg MP, Laman JD. Bacterial peptidoglycan and immune reactivity in the central nervous system in multiple sclerosis. *Brain.* 2001; 124:1544–1554.
- Schumacher GA, Beebe G, Kibler BG, Kurland LT, Kurtzke JF, McDowell F, Nagler B, Sibley WA, Tourtellotte WW, Willmon TL. Problems of experimental trials of therapy in multiple sclerosis: report by the panel on evaluation of experimental trials of therapy in multiple sclerosis. *Ann NY Acad Sci.* 1965; 122:552-568.
- Selmi C, Leung PSC, Sherr DH, Diaz M, Nyland JF, Monestier M, Rose NR, Gershwin ME. Mechanisms of environmental influence on human autoimmunity: A national institute of environmental health sciences expert panel workshop. *J Autoimmun.* 2012; 39(4):272-284.
- Shevach EM. Mechanisms of FoxP3+ regulatory cell-mediated suppression. *Immunity.* 2009; 30:636-645.
- Shevach EM, DiPaolo RA, Andersson J, Zhao DM, Stephens GL, Thornton AM. The lifestyle of naturally occurring CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Immunol Rev.* 2006; 212:60–73.
- Shibasaki H, McDonald WI, Kuroiwa Y. Racial modification of clinical picture of multiple sclerosis: comparison between British and Japanese patients. *J Neurol SCI.* 1981; 49:253-271.

Skurkovich S, Boiko A, Beliava I, Buglak A, Alekseeva T, Smirnova N, Kulakova O, Tchehonin V, Gurova O, Deomina T, Favorova OO, Skurkovic B, Gusev E. Randomized study of antibodies to IFN-gamma and TNFalpha in secondary progressive multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2001; 7:277–284.

Smolders J, Thewissen ML, Peelen E, Tervaert JW, Damoiseaux J, Hupperts R. Vitamin D Status Is Positively Correlated with Regulatory T Cell Function in Patients with Multiple Sclerosis. *Plos One.* 2009; 4(8):e6635

Spach KM, Noubade R, McElvany B, Hickey WF, Blankenhorn EP, Teuscher C. Nucleotide Polymorphism in Tyk2 Controls Susceptibility to Experimental Allergic Encephalomyelitis. *J Immunol.* 2009; 182:7776-7783.

Steinbrink K, Jonuleit H, Muller G, Schuler G, Knop J, Enk AH. Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanomaantigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood.* 1999; 93:1634–1642.

Steinhoff U, Brinkmann V, Klemm U, Aichele P, Seiler P, Brandt U, Bland PW, Prinz I, Zugel U, Kaufmann SH. Autoimmune intestinal pathology induced by hsp60-specific CD8 T cells. *Immunity.* 1999; 11:349–358.

Steinman L. Multiple sclerosis: a two-stage disease. *Nat Immunol.* 2001; 2:762 - 764.

Stephens LA, Mottet C, Mason D, Powrie F. Human CD4 (+) CD25(+) thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity in vitro. *Eur J Immunol.* 2001; 31:1247–1254.

Stojanovich L, Marisavljevich D. Stress as a trigger of autoimmune disease. *Autoimmun Rev.* 2008; 7:209-213.

Strobl H, Knapp W. TGF-beta 1 regulation of dendritic cells. *Microbes Infect.* 1999; 1:1283-1290.

Stroud NM, Minhan CL. The impact of regular physical activity on fatigue, depression and quality of life in persons with multiple sclerosis. *Health Qual Life Out.* 2009; 7:68.

Sydney M, Finegold SM, Downes J, Summanen PH. Microbiology of regressive autism. *Anaerobe* 2012; 18:260-262.

Tai P, Wang J, Jin H, Song X, Yan J, Kang Y, Zhao L, An X, Du X, Chen X, Wang S, Xia G, Wang B. Induction of regulatory T cells by physiological level estrogen. *J Cell Physiol.* 2008; 214:456-464.

Trøseid M, Nowak P, Nyström J, Lindkvist A, Abdurahman S, Sönnernborg A. Elevated plasma levels of lipopolysaccharide and high mobility group box-1 protein are associated with high viral load in HIV-1 infection: reduction by 2-year antiretroviral therapy. *AIDS.* 2010; 24(11):1733-1737.

van Winsen LML, Muris DFR, Polman CH, Dijkstra CD, van den Berg TK, Uitdehaag BMJ. Sensitivity to Glucocorticoids Is Decreased in Relapsing Remitting Multiple Sclerosis. *J Clinical Endocrinol Metab.* 2005; 90(2):734-740.

Venken K, Hellings N, Thewissen M, Somers V, Hensen K, Rummens J-L, Medaer R, Hupperts R, Stinissen P. Compromised CD4⁺ CD25^{high} regulatory T-cell function in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is correlated with a reduced frequency of FOXP3-positive cells and reduced FOXP3 expression at the single-cell level. *Immunol.* 2007; 123:79–89.

Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8:523–532.

Walker MR, Carson BD, Nepom GT, Ziegler SF, Buckner JH. De novo generation of antigen-specific CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells from human CD4⁺CD25⁻ cells. *Proc Nat Acad Sci.* 2005; 102:4103-4108.

Weber MS, Hohlfeld R, Zamvi SS. Mechanism of Action of Glatiramer Acetate in Treatment of Multiple Sclerosis. *Neurotherapeutics.* 2007; 4:647–653.

Willenborg DO, Fordham S, Bernard CC, Cowden WB, Ramshaw IA. IFN γ plays a critical down-regulatory role in the induction and effector phase of myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis, *J Immunol.* 1996; 157:3223–3227.

Wing K, Ekmark A, Karlsson H, Rudin A, Suri-Payer E. Characterization of human CD25⁺ CD4⁺ T cells in thymus, cord and adult blood. *Immunol.* 2002; 106:190–199.

Wingerchuk DM, Lennon VA, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Weinshenker BG. Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica. *Neurology.* 2006; 66:1485-1489.

Wolburg H, Paulus W. Choroid plexus: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 2010; 119:75-88.

Wong, CK, Wong PT, Tam LS, Li EK, Chen DP, Lam CW. Activation profile of Toll-like receptors of peripheral blood lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol.* 2010; 159:11–22.

Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* 2003; 3:199–210.

Xu L, Kitani A, Strober W. Molecular mechanisms regulating TGF- β -induced Foxp3 expression. *Mucosal Immunol.* 2010; 3:230-238.

Yanai H, Savitsky D, Tamura T, Taniguchi T. Regulation of the cytosolic DNA-sensing system in innate immunity: a current view. *Curr Opin Immunol.* 2009; 21(1):17–22.

Yang XO, Nurieva R, Martinez GJ, Kang HS, Chung Y, Pappu BP, Shah B, Chang SH, Schluns KS, Watowich SS, Feng XH, Jetten AM, Dong C. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory Tcell programs. *Immunity*. 2008; 29(1):44–56.

Yura M, Takahashi I, Serada M, Koshio T, Nakagami K, Yuki Y, Kiyono H. Role of MOG-stimulated Th1 type “light up” (GFP+) CD4+ T cells for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Autoimmun*. 2001; 17:17–25.

Zaghouani H, Hoeman CM, Adkins B. Neonatal immunity: faulty T-helpers and the shortcomings of dendritic cells. *Trend. Immunol*. 2009; 30:585-591.

Zarembek KA, Godowski PJ. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products and cytokines. *J Immunol*. 2002; 168:554-561.

Zhu J, Yamane H, Paul W.E. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Ann. Rev. Immunol*. 2010; 28:445-489.

ANEXO A- Termo de consentimento livre e esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Departamento de Microbiologia e Parasitologia

Laboratório de Imunofisiologia e Imunopatologia dos linfócitos T

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto

“Avaliação fenotípica e funcional dos linfócitos T de pacientes com neuromielite óptica”

Título do SubProjeto:

“Avaliação fenotípica e funcional dos linfócitos T de pacientes com neuromielite óptica: comparação com a esclerose múltipla”

Investigador Principal: Dra. Cleonice Alves de Melo Bento – Professora de Imunologia da UNIRIO.

Tels.: 2531-7906/ 2558-7586 / 9883-8948

EXPLICAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA AOS PARTICIPANTES

1.1- Propósito do estudo

O propósito desse estudo é avaliar o impacto de diferentes eventos imunes em pacientes com neuromielite óptica (NMO) e compará-los com indivíduos saudáveis e com pacientes com esclerose múltipla (EM). Assim podemos identificar alguns parâmetros que possam estar implicados na NMO.

1.2- Procedimentos

Durante a consulta clínica com o médico, uma vez estabelecido o diagnóstico de NMO, o médico fará algumas perguntas de relevância para o nosso estudo. Essas perguntas

objetivam avaliar relatos de intercorrências clínicas de relevância imunológica, tais como o número de episódios de surtos ao ano, ocorrência de reações alérgicas e de outras imunopatologias, com definição do tipo de desordem imunológica de fundo auto-imune.

Após a entrevista, e com o consentimento oral e por escrito do paciente, o médico irá colher o volume total de 20 mL de sangue periférico que será utilizado para realizar uma avaliação quantitativa e qualitativa de seu sistema imune.

1.3- Riscos e desconfortos

A aplicação das perguntas não oferece nenhum tipo de risco ou desconforto. Caso você esteja se sentindo desrespeitado, pode interrompê-lo a qualquer momento. A obtenção do sangue periférico será conduzida por seu médico e utilizará todo o material sob condições adequadas.

1.4- Benefícios

Os resultados obtidos pelo estudo serão analisados pelo nosso grupo. Estes resultados poderão fornecer informações importantes relacionadas à NMO. Mas, eles podem não lhe trazer benefícios imediatos, desde que são necessários vários anos de estudos em um número elevado de pacientes. No entanto, caso os achados sejam significativos, o seu médico terá acesso a todos eles e poderá, caso julgue necessário, apresentá-los a você.

1.5- Alternativas para a participação

Sua participação nesse estudo é voluntária. Você poderá interromper a entrevista ou não permitir a coleta de seu sangue a qualquer momento, sem nenhum problema para você. Você também poderá se retirar do estudo a qualquer momento sem nenhum prejuízo quanto ao seu atendimento pela equipe médica hospitalar.

1.6- Custos e compensações

Você não pagará nada para participar nesse estudo. Você não será pago por estar no estudo.

1.7- Confidenciabilidade

Este estudo envolve informações confidenciais. Essas informações serão mantidas estritamente confidenciais entre os membros envolvidos na pesquisa. Qualquer publicação científica dos resultados não identificará você.

1.8- Direito para se retirar da pesquisa

Sua participação é voluntária. Você não é obrigado a participar nessa pesquisa. Você é livre para interromper a qualquer momento sua participação.

1.9- Perguntas ou problemas

Se você tem alguma pergunta ou problema quanto a esse estudo, entre em contato com Dr^a. Regina Maria Papais Alvarenga ou Dr^a. Cleonice Alves de Melo Bento, professora e Imunologista da UNIRIO tel: 2264-2723 ou 2531-7906.

1.10- Consentimento

Uma vez que você leu (ou lhe foi explicado) e entendeu o propósito desse estudo, os procedimentos que serão realizados, os riscos e benefícios, e você VOLUNTARIAMENTE concorda em fazer parte desse estudo, favor assinar seu nome abaixo:

Nome do Indivíduo entrevistado:

Assinatura do Indivíduo entrevistado:

Eu expliquei o propósito do estudo para o paciente. Ao meu entender, ela entendeu o propósito, procedimentos, riscos e benefícios desse estudo.

Nome do Investigador:

Assinatura do Investigador:

Testemunha:

Assinatura da Testemunha:

Data:

ANEXO B- Comitê de ética em pesquisa**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP-UNIRIO**
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - UNIRIO**PARECER CONSUBSTANCIADO**

TTDD:232

Assunto: Projetos de Pesquisa – Avaliação.

Protocolo CEP-UNIRIO: 0042/2011 **FR** 460879 **CAAE:** 0050.0.313.000-11**Projeto de Pesquisa:** Avaliação fenotípica e funcional da Linfócitos T de pacientes com neuromielite óptica.**Versão do Protocolo e Data:** 09/09/2011.**Pesquisador(a) Responsável:** Cleonice Alves de Melo Bento.**Instituição:** Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO.**Sumário do protocolo:**

- **Objetivos:** avaliar o perfil imunológico de pacientes com neuromielite óptica (NMO) em resposta a diferentes estímulos antigênicos; avaliar a proliferação dos linfócitos T mediante ativação por diferentes antígenos e patógenos; a frequência de diferentes subpopulações de células T no sangue periférico de pacientes com Neuromielite Óptica; a frequência e a situação funcional das células dendríticas no sangue periférico dos pacientes em questão; o impacto de diferentes neurotransmissores do stress na função in vitro das células T dos pacientes com NMO; quantificar a produção in vivo e in vitro de citocinas relacionadas aos fenótipos inflamatórios e anti-inflamatórios de células T nos pacientes com NMO.

- **Súmula do Projeto:** o projeto tem como foco o estudo da neuromielite óptica, doença desmielinizante do sistema nervosa central. O status funcional de células imunológicas de pacientes será avaliado. Serão utilizados pacientes do Hospital da Lagoa, com critério de inclusão o diagnóstico dos diversos tipos de NMO, e exclusão obesidade mórbida, consumo de álcool e tabaco. Ocorrerá a coleta de 20 mL de sangue para quantificação de células imunológicas e estudo de cultura de células para avaliação de proliferação e viabilidade celular. Para as análises estatísticas serão utilizados testes não paramétricos.

- **Comentários do Relator:** projeto de relevância científica e adequadamente discutido na sua introdução, justificativa e metodologia. Foi descrito o destino da cultura de celular; definição pelo pesquisador do período de tempo para seleção dos pacientes na metodologia e/ou esgotamento amostral; O cronograma está adequado.

- **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido:** está de acordo com as Normas da Resolução 196/96.



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP-UNIRIO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - UNIRIO

- O sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.
- O pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

- Informo que a autorização para posterior publicação fica condicionada à apresentação do resumo do estudo proposto à apresentação.

Diante do exposto, o Comitê de ética em Pesquisa da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – CEP – UNIRIO, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS196/96 e suas complementares, manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

Emitimos, portanto, parecer que classifica o projeto como **APROVADO**.

Rio de Janeiro, 18 de novembro de 2011.


Fabiana Barbosa Assumpção de Souza
Coordenadora do CEP-UNIRIO

Fabiana B. Assumpção de Souza
Coordenadora
CEP - UNIRIO
PROPG-DPQ