



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**



## **TESE DE DOUTORADO**

***LACTOCOCCUS LACTIS* PRODUTOR DE HSP65 INIBE A  
ENCEFALOMIELEITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL MURINA  
PREVENINDO A MIGRAÇÃO DE CÉLULAS T PARA A MEDULA  
ESPINHAL**

**Mauro Andrade de Freitas Guimarães**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA**

**Belo Horizonte  
2017**

***Lactococcus lactis* produtor de HSP65 inibe a encefalomielite autoimune experimental murina prevenindo a migração de células T para a medula espinhal**

Tese apresentada ao Curso de pós-graduação do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte do requisito para obtenção do título de doutor.

**Doutorando: Mauro Andrade de Freitas Guimarães**

**Orientadora: Dra. Ana Maria Caetano de Faria**

**Co-orientador: Rafael Machado Rezende**

**(Brigham and Women's Hospital, Harvard Med.School, Estados Unidos)**

**Belo Horizonte**

**2017**

*Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Imunobiologia (LIB) do Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.*

*Apoio financeiro:* Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG-PRONEX)

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê. ” (Arthur Schopenhauer)

“Aqueles que se sentem satisfeitos sentam-se e nada fazem. Os insatisfeitos são os únicos benfeitores do mundo. ”  
(Walter S. Landor)

*Dedico este trabalho à minha família e às pessoas que  
dele fizeram parte, pela convivência, auxílio e apoio  
incondicional.*

## RESUMO

A esclerose múltipla é uma doença autoimune, de fundo genético, que afeta o sistema nervoso central. As manifestações iniciais são derivadas de respostas imunológicas intensas que afetam principalmente a substância branca do cérebro e da medula espinhal, sendo seguidas por uma fase crônica com caráter neurodegenerativo. Diante da complexidade da doença e da dificuldade de tratamento, nosso grupo de pesquisa tem estudado alternativas imunorregulatórias capazes de reduzir os sinais clínicos da doença que apresentem poucos ou nenhum efeito adverso. Previamente a esse trabalho, utilizamo-nos de um protocolo para indução de tolerância oral a HSP65 produzida pela bactéria recombinante *Lactococcus lactis* através do qual obtivemos bons resultados na prevenção dos sintomas da encefalomielite autoimune experimental (EAE) induzida em camundongos C57BL/6 pela imunização com o antígeno mielínico MOG. No presente trabalho, o mesmo protocolo foi utilizado para o tratamento da EAE depois da sua indução. Camundongos imunizados com MOG receberam por via oral a cepa *Lactococcus lactis* produtora da proteína de choque térmico HSP65, durante cinco dias. O tratamento foi eficiente na redução do índice clínico da EAE da mesma forma que na prevenção da doença. Foi observado por análise histológica e microscopia intravital que o tratamento inibiu o recrutamento de leucócitos para a medula espinhal tanto no parênquima quanto nos vasos sanguíneos que irrigam as meninges. Nos órgãos linfoides secundários, houve um aumento na frequência das células T reguladoras, principalmente aquelas que expressam a forma de membrana da citocina TGF- $\beta$  (*latent associate peptide* - LAP). Não houve alteração na frequência de linfócitos T CD4+ ativados nos animais tratados indicando que o mecanismo de inibição não envolve imunossupressão.

**Palavras chave:** encefalomielite autoimune experimental; tratamento; *L.lactis* produtor de HSP65; imunorregulação

## ABSTRACT

Multiple sclerosis is a genetic and autoimmune disease that affects the central nervous system. The initial manifestation is an intense immune response that primarily affects the white matter of the brain and spinal cord, followed by a chronic phase with a neurodegenerative character. Because of the complexity of the disease and the difficulty to treat, has been testing therapeutic alternatives that would modulate the disease development presenting minimal side effects. In a previous study, we used a protocol for the induction of oral tolerance using a recombinant HSP65-producing *Lactococcus lactis* and we obtained good results in the prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), induced in C57BL / 6 mice by MOG immunization. In the present study, the same protocol was used for the treatment. In the present study, mice received orally HSP65-producing *Lactococcus lactis* strain for five days after disease induction. The treatment was as efficient in reducing the clinical score of EAE as the prevention protocol. Using histological analysis and intravital microscopy, we observed that the treatment inhibited the recruitment of leukocytes to the spinal cord, both in the parenchyma and in the blood vessels that irrigate the meninges. In the secondary lymphoid organs, there was an increase in regulatory T cells, especially those that express the membrane form of the cytokine TGF- $\beta$  in the membrane (LAP). This effect occurred with no alteration in the frequency of activated lymphocytes indicating that there immunoregulation was not associated with immunosuppressive.

**Keywords:** experimental autoimmune encephalomyelitis; treatment; HSP65-producing *L.lactis*; immunoregulation

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. JUSTIFICATIVA.....	3
3. ESTADO DA ARTE.....	7
3.1. Etiologia.....	6
3.2 Aspectos clínicos.....	8
3.3 Tratamento.....	9
3.4 Patologia.....	10
3.5 Aspectos imunológicos.....	11
3.6 A encefalomielite autoimune experimental.....	14
3.7 Tolerância oral.....	15
3.8 As proteínas de choque térmico.....	17
4. OBJETIVOS.....	19
4.1 Objetivo geral.....	19
4.2 Objetivos específicos.....	19
5. METODOLOGIA.....	20
5.1 Animais.....	20
5.2 Desenho experimental.....	20
5.3 Obtenção das linhagens bacteriana.....	21
5.4 Crescimento das cepas e indução da expressão do plasmídeo.....	22
5.5 Administração do <i>Lactococcus lactis</i> por via oral.....	22
5.6 Indução da encefalomielite autoimune experimental.....	23
5.7 Índice macroscópico.....	23
5.8 Histologia.....	24
5.9 Extração de células para citometria de fluxo.....	24
5.10 Citometria de fluxo.....	24
5.11 Microscopia intravital.....	25

5.12 Análises estatísticas.....	27
6. RESULTADOS.....	28
6.1 A administração oral do <i>Lactococcus lactis</i> produtor de HSP65 trata os sinais clínicos da EAE.....	28
6.2 O tratamento com o <i>L.lactis</i> produtor de HSP65 reduz os sinais inflamatórios no sistema nervoso central.....	29
6.3 Perfil de ativação dos linfócitos T CD4+ nos órgãos linfóides.....	31
6.4 Fenótipo das células T reguladoras nos órgãos linfóides.....	33
6.5 O <i>L.lactis</i> produtor de HSP65 não influencia na frequência das células CD4+ possivelmente patogênicas.....	36
6.6 A prevenção da EAE ocorre pela redução da migração de leucócitos para a medula espinhal.....	39
7. DISCUSSÃO.....	39
8. PERSPECTIVAS.....	52
9. CONCLUSÃO.....	53
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: o <i>Lactococcus lactis</i> produtor de HSP65 previne a encefalomielite autoimune experimental.....	4
Figura2: Desenho experimental.....	21
Figura 3: representação esquemática do vetor de HSP65 com sistema de expressão extracelular induzido por xilose.....	22
Figura 4: Microscopia intravital.....	26
Figura 5: A administração oral do <i>Lactococcus lactis</i> produtor de HSP65 trata os sinais clínicos da EAE.....	28
Figura 6: O tratamento com o <i>L.lactis</i> produtor de HSP65 reduz os sinais inflamatórios no sistema nervoso central.....	30
Figura 7: Perfil de ativação dos linfócitos T CD4+ nos órgãos linfoides.....	32
Figura 8: Fenótipo das células T reguladoras nos órgãos linfoides.....	33
Figura 9: O <i>L.lactis</i> produtor de HSP65 não influencia na frequência das células CD4+ possivelmente patogênicas .....	36
Figura 10: A prevenção da EAE ocorre pela redução da migração de leucócitos para a medula espinhal.....	37

## LISTA DE ABREVIATURAS

- EAE: encefalomielite autoimune experimental (*experimental autoimmune encephalomyelitis*)
- MOG: *myelin oligodendrocyte glycoprotein*
- HSP: proteína de choque térmico (*heat shock protein*)
- Th: linfócito *T helper*
- TGF- $\beta$ : transforming growth factor  $\beta$
- LAP: forma de membrana do TGF- $\beta$  (*latency associated peptide*)
- CXCR; CCR: receptores de quimiocina
- MHC: complexo de histocompatibilidade principal (*major histocompatibility complex*)
- CIS: síndrome clínica isolada (*clinical isolated syndrome*)
- FDA: *food and drug administration*
- TCR: receptor de célula T (*T cell receptor*)
- IFN- $\gamma$ : interferon- $\gamma$
- APC: célula apresentadora de antígeno (*antigen presenting cells*)
- DC: célula dendrítica (*dendritic cell*)
- VLA-4: *very late antigen-4*
- VCAM-1: *vascular cell adhesion molecule-1*
- ICAMs: *intercellular adhesion molecules*
- LFA-1: *lymphocyte function-associated antigen-1*
- CXCL; CCL: quimiocinas
- NK: *natural killer*
- Foxp3: Forkhead box P3
- CTLA-4 :*cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*
- PLP: *proteolipid protein*
- TNF- $\alpha$  :*tumor necrosis factor- $\alpha$*
- GALT: *gut associated lymphoid tissue*
- OVA: ovoalbumina
- MBP: *myelin basic protein*
- TLR: toll like receptor
- LPS: lipopolissacarídeo
- CFA: adjuvante completo de Freund (*complete Freund adjuvante*)
- LDL: *low density lipoprotein*
- DSS: *dextran sulfate sodium*
- IL: interleucina

## 1. INTRODUÇÃO

A esclerose múltipla é uma doença autoimune, de fundo genético, que afeta o sistema nervoso central. O nome da doença designa as placas formadas por tecidos cicatriciais enrijecidos (esclerose) observadas de forma difusa nos órgãos acometidos (MURAY, 2009). As alterações patológicas causadas pela esclerose múltipla podem acometer o cérebro, medula espinhal e os nervos ópticos (PENDER; GREER, 2007). Trata-se da principal causa de incapacitação neurológica não traumática em jovens adultos da Europa e Estados Unidos, e aproximadamente 2,5 milhões de pessoas em todo o mundo possuem a doença. As primeiras manifestações geralmente são iniciadas entre os 20 e 30 anos, sendo o desenrolar da doença incerto, o que afeta a vida pessoal e profissional dos pacientes. (TRAPP; NAVE, 2008; DENDROU; FRUGGER; FRIESE, 2015).

Cerca de 85% dos pacientes apresentam a doença inicialmente em uma fase de surto e remissão, na qual períodos curtos de intensa inflamação são sucedidos por recuperação neuronal. Mulheres têm o dobro de probabilidade que os homens de apresentar esse padrão (TRAPP; NAVE, 2008). Nessa fase, as lesões são concentradas na substância branca do cérebro e medula espinhal, sendo a inflamação o principal desencadeante das lesões (LASSMANN; BRUCK; LUCCHINETTI, 2007). Na remissão, ocorre resolução da inflamação e dos edemas e a remielinização dos axônios, o que restabelece sua capacidade de condução (TRAPP; NAVE, 2008).

Passada a etapa de surtos e remissões, a maioria dos pacientes atinge o estágio crônico da doença, conhecido como esclerose múltipla secundária progressiva, em que os danos neurológicos são contínuos e irreversíveis (TRAPP; NAVE, 2008). Nesse caso, não é mais a inflamação a única causadora das lesões. Observa-se uma atrofia difusa tanto na substância branca como na cinzenta, sendo o córtex atingido. (LASSMANN; BRUCK; LUCCHINETTI, 2007). A fase crônica é acompanhada por um aumento da complexidade dos mecanismos causadores das lesões e da dificuldade de se estabelecer um tratamento eficiente. Com o decorrer do tempo, a inflamação torna-se uma variável menos relevante na doença, e os tratamentos convencionais com anti-inflamatórios tornam-se menos eficazes (FRISCHER J.M *et al*, 2009).

Diante desse contexto apresentado, pode-se perceber o grau de complexidade dessa doença autoimune, tanto nos seus aspectos etiológicos e patológicos, quanto nas questões

relativas à sintomatologia e à prática clínica. A elaboração de um tratamento efetivo para cada paciente torna-se algo desafiador, visto que muitos não são completamente eficazes e os efeitos colaterais são muito relevantes. Nosso grupo de pesquisa do Laboratório de Imunobiologia da Universidade Federal de Minas Gerais tem procurado, nos últimos anos, estudar diversos modelos de doenças autoimunes, seus mecanismos e possíveis formas de prevenção e tratamento. O foco tem sido na obtenção de respostas imunorregulatórias que permitem, através de agentes com efeitos colaterais mínimos, que os sinais clínicos dessas doenças sejam reduzidos significativamente. Resultados muito expressivos já foram obtidos em modelos murinos de doença de Crohn, colite ulcerativa, artrite reumatoide e esclerose múltipla, essa última o foco deste trabalho (REZENDE *et al*, 2013; GOMES-SANTOS *et al*, 2011;).

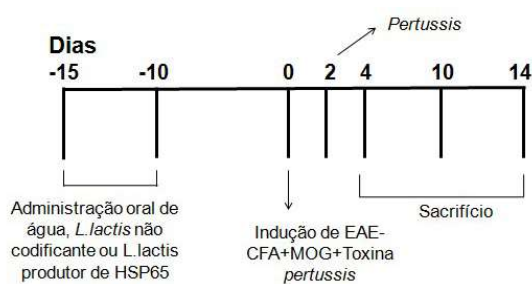
## 2. JUSTIFICATIVA

Utilizando-nos de protocolos para indução de tolerância oral, em que a ingestão contínua de determinadas proteínas modula a resposta imune específica para as mesmas e proporciona um efeito tolerogênico (VAZ *et al*, 1977), obtivemos bons resultados na prevenção dos sintomas da encefalomielite autoimune experimental (EAE), induzida em camundongos C57BL/6 através da imunização com o antígeno mielínico MOG (peptídeo 35-55 da *myelin oligodendrocyte glycoprotein*). As proteínas HSPs (*heat shock proteins*), por terem significativas ações no sistema imune e pela sua capacidade de induzir a geração de células T reguladoras (citado posteriormente, no Estado da Arte), tornaram-se boas candidatas para serem usadas em experimentos de tolerância oral. Além disto, essas proteínas são muito expressas durante a inflamação crônica, o que as torna um bom alvo terapêutica para doenças inflamatórias crônicas cujo antígeno alvo da resposta imune não é conhecido. Nosso grupo utilizou a HSP65 (com uma composição idêntica à de *Mycobacterium leprae*, análoga à HSP60 de mamíferos) para esse fim. A proteína é produzida e secretada pela bactéria gram-positiva e não invasiva *Lactococcus lactis* da cepa NCDO2118 contendo um plasmídeo codificador da HSP65. Dessa forma, a proteína é expressa e secretada para o meio extracelular em um sistema induzido através de xilose. A administração oral desse *Lactococcus* recombinante permite que a HSP65 seja secretada diretamente no intestino. Essa metodologia traz, portanto, os benefícios da tolerância oral induzida por pequenas doses, e ainda evita a necessidade de isolar, purificar e armazenar essa proteína. A outra vantagem é a produção em escala contínua de HSP65 livre de endotoxina.

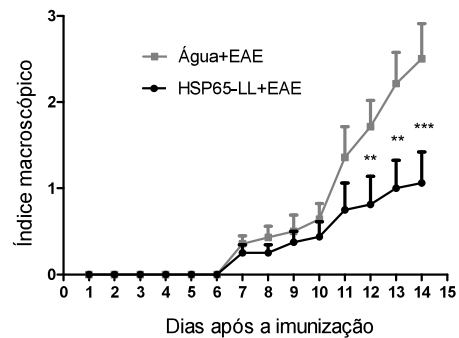
Após o tratamento oral com o *Lactococcus lactis* produtor de HSP65, os camundongos eram imunizados com MOG para a indução da EAE. Foi verificado que o tratamento oral induzia tolerância nos animais e prevenia o desenvolvimento dos sinais clínicos típicos do modelo. Estudamos os mecanismos envolvidos nesse efeito protetivo, com foco inicialmente nos órgãos linfóides, utilizando medidas de citocinas e estudo fenotípico de células T durante o desenvolvimento da EAE (REZENDE *et al*, 2013). Posteriormente, durante meu trabalho de Mestrado, analisamos aspectos relativos a migração celular (expressão de integrinas e receptores de quimiocinas nos órgãos linfóides) para averiguar se a entrada de leucócitos na medula espinhal (por microscopia intravital) e o perfil de células T reguladoras nesse local eram afetados pelo tratamento prévio com *L.lactis* HSP65 (GUIMARÃES, 2013).

Nesse trabalho prévio, constatamos que o efeito modulador do HSP65 foi devido a um aumento da ação regulatória do sistema imune dos animais, com aumento principalmente das células Th3 (aquelas que expressam o TGF- $\beta$  em sua forma latente, a molécula LAP) e de citocinas anti-inflamatórias nos órgãos linfoides nos dias iniciais após a imunização. Houve também alterações na expressão de receptores de quimiocinas e de integrinas nas células T CD4+ no baço. Enquanto a frequência de células T CD4+ expressando CXCR3 (considerado anti-inflamatório nesse modelo) aumentou, a proporção de células T CD4+ expressando CCR6 (molécula associada à migração de linfócitos Th17) diminuiu. Também houve redução dos linfócitos expressando a integrina  $\alpha 4\beta 1$ , associada à entrada das células Th1 no sistema nervoso central como um todo e das Th17 na medula espinhal. Todos esses fatores contribuíram para o que foi observado na microscopia intravital. No pico dos sinais clínicos, no 14º dia após a imunização, constatou-se que no grupo de animais tratados com *Lactococcus lactis* produtor de HSP65 houve redução do número de leucócitos rolando e aderindo nos vasos sanguíneos próximos à medula espinhal (GUIMARÃES, 2013).

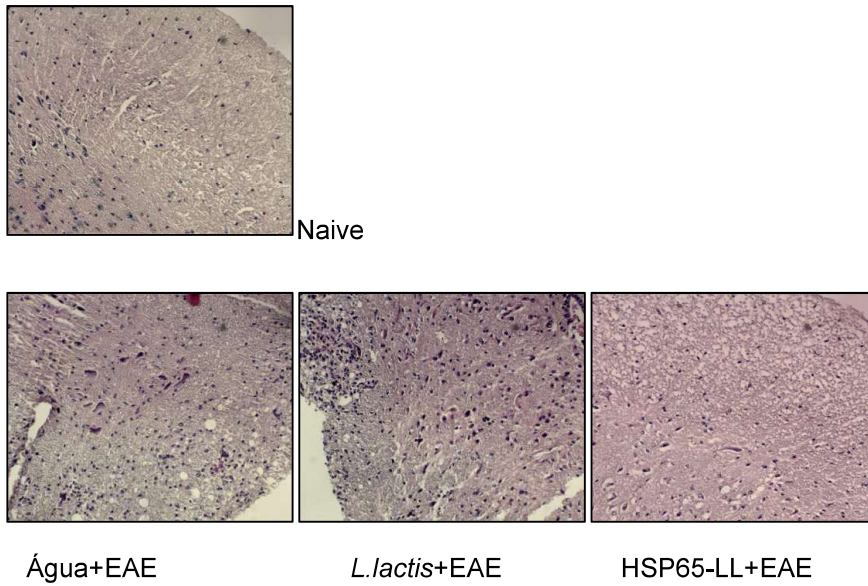
**A**



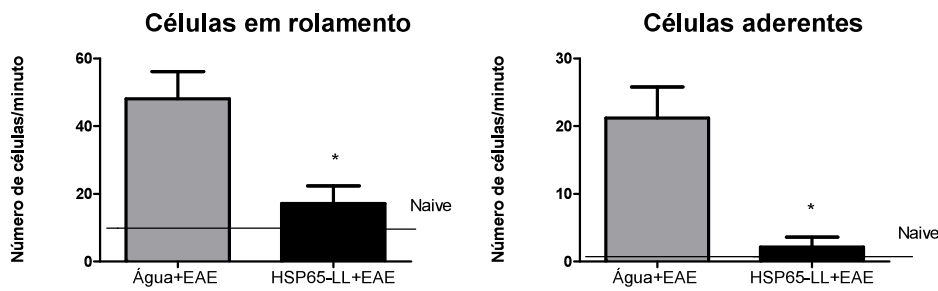
**B**



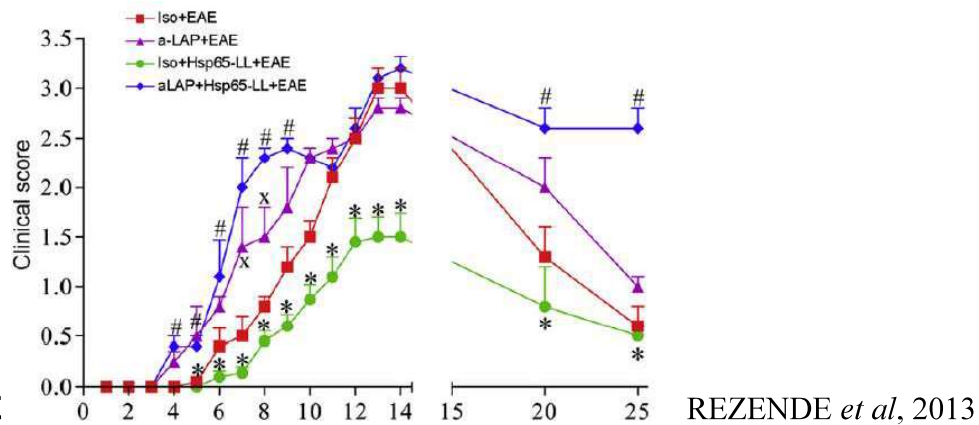
C



D



E



**Figura 1: o *Lactococcus lactis* produtor de HSP65 previne a encefalomielite autoimune experimental.**

(A): Modelo experimental do mestrado. Animais C57BL/6 ou C57BL/6 Foxp3-GFP, fêmeas, entre 6 e 8 semanas de vida, receberam por via oral *ad libitum* durante 5 dias água, *Lactococcus lactis* contendo plasmídeo extra não codificante (cepa utilizada apenas para a obtenção de parâmetros histológicos) ou *Lactococcus lactis* com

plasmídeo extra produtor de HSP65. O meio contendo a bactéria foi trocado diariamente. Dez dias após o final do tratamento oral, os animais foram imunizados para a indução da EAE. Por fim, em dias específicos após a imunização (4, 10 e 14) foram sacrificados. **(B):** Foram utilizados 14 animais no grupo Água+EAE, e 15 no grupo HSP65+EAE. O curso da EAE é demonstrado pela média do índice clínico de cada animal  $\pm$  padrão. **(C):** Secções transversais representativas da medula espinhal de animais C57BL/6, coradas com hematoxilina-eosina (HE). Camundongos C57BL/6 foram tratados com água (grupo Água+EAE), com *L.lactis* portando o plasmídeo não codificante (*L.lactis*+EAE) ou com *L.lactis* produtor de HSP65 (grupo HSP65+EAE) por 5 dias, e 10 dias depois foram imunizados para a indução de EAE. As imagens referem-se ao 14º dia após a imunização. Aumento: 100x. **(D):** Camundongos C57BL/6 foram tratados com água (grupo Água+EAE) ou com *L.lactis* produtor de HSP65 (grupo HSP65+EAE) por 5 dias, e 10 dias depois foram imunizados para a indução de EAE. No 14º dia após a imunização, 5 animais por grupo foram submetidos a análises por microscopia intravital. **(E):** demonstração da dependência das células Th3 para a prevenção da EAE. A depleção das células que expressam LAP impede que o tratamento oral com o *L.lactis* que expressa o HSP65 (linha azul) consiga reduzir o índice macroscópico. O Teste t de Student foi utilizado para comparações entre dois grupos experimentais. Utilizou-se a análise de variância (ANOVA), com o teste de Tukey, para calcular a significância entre três grupos. A média do grupo *Naive* é representada como uma linha para referência, não interferindo na análise estatística. \* Representa  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,1$ ; \*\*\*  $p < 0,01$ .

Como o efeito modulador do tratamento com o *L.lactis* produtor de HSP65 já foi bem definido e descrito por nosso grupo (modelo experimental e principais resultados na figura 1), o próximo passo seria verificar a eficácia desse modelo de indução de tolerância oral também no tratamento da doença bem como estudar os principais mecanismos envolvidos. A perspectiva de tratamento torna-se então mais relevante que a prevenção, visto que a indução da tolerância oral após a imunização é menos descrita na literatura e o estudo de metodologias de tratamento da esclerose múltipla baseado na imunorregulação pode ser de grande utilidade para a clínica.

### 3. ESTADO DA ARTE

#### 3.1 Etiologia

A etiologia exata da esclerose múltipla ainda é desconhecida, porém sabe-se que esta possui um fundo imunogenético obrigatório, e que fatores ambientais são importantes desencadeadores da patologia. Dados epidemiológicos sustentam o fator genético da doença, visto que em certas famílias a incidência é muito maior que em outras, e que a prevalência é substancialmente aumentada em pessoas que possuem familiares doentes. Já a análise das variáveis geográficas é mais complexa, pois aspectos ambientais também podem estar implicados. (SOSPEDRA; MARTIN, 2005).

Dos genes candidatos a serem relevantes para o desencadeamento da doença, destacam-se aqueles localizados no cromossomo 6p21, na região codificante do complexo principal de histocompatibilidade, o MHC (*major histocompatibility complex*), que em humanos recebe o nome de HLA (*human leukocyte antigen*). Esses genes podem ter de 10% a 60% de contribuição para a ocorrência da doença (HAINES *et al*, 1998). Os genes que podem conferir riscos são localizados principalmente nas regiões DR e DQ, pertencentes ao MHC de classe II, e a significância deles depende da população (SOSPEDRA; MARTIN, 2005).

Quanto aos fatores ambientais envolvidos na esclerose múltipla, esses podem ser infecciosos ou não. Dos aspectos relativos às infecções, a “Hipótese da Higiene” é utilizada como tentativa de explicar o fato de que nos locais em que seus habitantes são expostos a uma vasta gama de microorganismos quando jovens, o estímulo precoce do sistema imune gera mecanismos imuno-reguladores anti-inflamatórios. Isso faz com que esses indivíduos tenham menor probabilidade de apresentarem doenças inflamatórias crônicas tais como alergias e doenças autoimunes quando adultos (BACH, 2005; FLEMING; COOK, 2006). Entretanto, nem todos os estímulos antigênicos têm a mesma influência quanto ao desencadeamento da doença. Indivíduos soronegativos para o vírus Epstein-Barr têm uma probabilidade bem menor de desenvolver a esclerose múltipla. É justamente a resposta imunológica gerada pela infecção com esse vírus a possível responsável pelo desencadeamento da doença. (ASCHERIO; MUNGER, 2007a). Dentre os fatores ambientais não relacionados às infecções, a exposição à luz solar com conseqüente síntese de vitamina D tem sido considerada importante para a prevenção da esclerose múltipla (ASCHERIO; MUNGER, 2007b).

Uma hipótese elaborada recentemente para a etiologia da esclerose múltipla é que ela é mais relacionada com uma desregulação na permeabilidade da barreira hematoencefálica e consequente aumento da concentração de linfócitos T e B no sistema nervoso central do que propriamente uma quebra da tolerância e resposta autoimune contra antígenos específicos no cérebro e medula espinhal. O que ocorreria é uma desregulação de uma interação fisiológica que ocorre entre antígenos expressos nas células endoteliais do sistema nervoso e anticorpos, através de eventos clínicos, como infecção pelo vírus Epstein-Barr ou outros fatores de risco, como alimentação e genes específicos. Esse processo, então, poderia desencadear a resposta celular existente na doença (SOULILLOU, 2013). Recentemente foi também demonstrado que mesmo indivíduos com uma infecção nasofaríngea subclínica pela bactéria *Bordetella pertussis* têm maior possibilidade de desenvolver esclerose múltipla, sendo interessante ressaltar que a Toxina Pertussis é fundamental no processo de indução do modelo murinho de encefalomielite autoimune experimental (RUBIN; GLAZER, 2016).

### **3.2 Aspectos clínicos**

Os sintomas da esclerose múltipla são vários, incluindo fraqueza, formigamento e dormência dos membros, vertigens, perdas visuais ou visão dupla. Tais manifestações refletem os locais de formação das placas. Desordens urinárias e intestinais também são frequentemente relatadas. Dos distúrbios mais relacionados à esclerose múltipla destacam-se os cognitivos, pois aparecem entre 40% e 60% dos pacientes. Ocorre perda da memória ligada à recordação (porém sem afetar o ato de reconhecimento) e dificuldade de executar tarefas, devido ao acometimento da memória de trabalho, habilidade verbal e utilização de estratégias e estimativas. Os aspectos cognitivos são mais afetados na fase progressiva da doença (McDONALD; RON, 1999).

Não existem testes específicos que diagnosticam a esclerose múltipla. A doença é distinguível principalmente por padrões clínicos. É necessário que se observe lesões em, no mínimo, dois sítios distintos do sistema nervoso central, e que o paciente já tenha tido ao menos dois episódios de manifestações neurológicas típicas da esclerose múltipla. O diagnóstico inicial da doença é muito mais complexo do que o acompanhamento clínico de um paciente com a doença já diagnosticada (McDONALD; RON, 1999). Embora os efeitos da doença na cognição do indivíduo sejam significativos, o uso desses parâmetros muitas vezes é subestimado na prática clínica, porque relatos do próprio indivíduo não podem ser usados para a mensuração da capacidade cognitiva, e testes pré-estabelecidos para avaliar essas desordens

muitas vezes não são específicos para diagnosticar a esclerose múltipla em pacientes. Dos que são mais aceitos atualmente, destacam-se dois: o Brief Repeatable Battery of Neuropsychological e o Minimal Assessment of Cognitive Function in Multiple Sclerosis. Enquanto o primeiro é realizado em um tempo mais curto e é mais difundido na Europa, o último inclui a avaliação do processamento espacial e das funções executivas (ROCCA *et al*, 2015).

Em 2013, o *International Advisory Committee on Clinical Trials of MS* revisou alguns parâmetros estabelecidos em 1996 por esse mesmo grupo, sobre aspectos clínicos da esclerose múltipla. Ficou estabelecido que a síndrome clínica isolada (*clinical isolated syndrome*, CIS), que consiste no primeiro evento neurológico causado por inflamação ou desmielinização, agora está incluído na descrição inicial da doença, juntamente com imagens obtidas por ressonância magnética. O tratamento iniciado em pacientes ainda com CIS geralmente impede que ocorra uma segunda manifestação (LUBLIN *et al*, 2014).

### **3.3 Tratamento**

As terapias utilizadas para a esclerose múltipla devem variar de acordo com o estágio da doença em que o paciente se encontra. Como já citado anteriormente, a fase inicial e a progressiva diferem quanto aos aspectos clínicos e patológicos. Os resultados mais eficazes são observados quando os medicamentos são administrados na fase de surto-remissão, pois o fator desencadeante é a inflamação, enquanto na fase mais tardia a neurodegeneração torna-se um fator muito significativo, e a resolução da doença é mais complexa, pois passa pelo reparo do sistema nervoso já acometido (WEINER, 2009).

Das drogas usadas no tratamento da esclerose múltipla, destacam-se as imunomodulatórias e as imunossupressoras. No primeiro grupo, uma das mais administradas é o interferon- $\beta$ , que já foi demonstrado como eficiente em reduzir os relapsos, o agravamento dos sintomas e a progressão da doença. Já o Natalizumab e o Alemtuzumab são anticorpos monoclonais humanizados. (LOMA; HEYMAN, 2011). O Natalizumab foi demonstrado como muito eficiente em reduzir os sinais da doença de forma rápida e continuada (já dentro dos primeiros 3 meses de tratamento), mesmo em pacientes com um quadro mais grave (KAPPOS *et al*, 2013). É importante ressaltar que todas essas drogas têm efeitos colaterais, desde inflamações no local da aplicação até alterações metabólicas importantes e manifestações clínicas, como taquicardia e trombocitopenia (LOMA; HEYMAN, 2011).

O grupo das drogas imunossupressoras é aquele em que os efeitos colaterais são mais graves, como menor resistência às infecções e surgimento de neoplasias. Por isso, não são as mais desejáveis para o tratamento. Porém, as drogas padrão para o tratamento da esclerose múltipla na fase inicial ainda são do grupo dos corticoesteróides. Seus efeitos em prazos mais longos ainda não são muito claros. Atuam inibindo a proliferação de linfócitos e a síntese de citocinas pró-inflamatórias (LOMA; HEYMAN, 2011).

As pesquisas mais recentes que visam o desenvolvimento de novas terapias para a esclerose múltipla têm focado em tratamentos por via oral. Um exemplo é a administração de fingolimod, que atua prevenindo a entrada de linfócitos no sistema nervoso central. Os testes em humanos demonstram resultados positivos e com poucos efeitos colaterais na fase inicial da doença (KAPPOS *et al*, 2010). Um dos mais recentes tratamentos orais é com o BG-12 (dimetil-fumarato), aprovado em 2013 pelo FDA (*Food and Drug Administration*). Ele tem o potencial de reduzir a gravidade e a proporção de pacientes apresentando relapsos, bem como as lesões observadas por ressonância magnética. (WINKELMANN, 2014; FOX, 2012). O Teriflunomide, também outra droga ministrada por via oral, atua na inibição de células B e T com maior potencial autorreativo, conduz uma mudança no perfil de citocinas (estimulando as anti-inflamatórias) e mudança de classe das imunoglobulinas. Esses mecanismos reduzem a frequência dos relapsos e da gravidade das lesões observadas por ressonância magnética (COMI; RADAELLI; SORENSEN, 2017).

Outro tratamento alternativo é a aplicação de uma mistura de peptídeos mielínicos por via transdermal (através de adesivos na pele) em pacientes na fase relapso-remissão. Esse tratamento foi demonstrado como eficiente em reduzir o número de lesões no sistema nervoso central e reduzir a quantidade de relapsos no grupo de pacientes testados (WALCZAK, 2013).

### **3.4. Patologia**

Nas fases iniciais da esclerose múltipla, a principal alteração patológica observada é um processo inflamatório mediado principalmente por macrófagos, e que causa a transecção dos axônios (DUTTA; TRAPP, 2007). Pelo fato de a mielina ter, como uma de suas funções, a estabilização do esqueleto axonal, sua perda pode acarretar em danos para a fisiologia do axônio, deixando-o mais vulnerável à inflamação. O meio em que a inflamação ocorre contém várias substâncias que podem contribuir para a lesão dos axônios, como radicais livres, enzimas proteolíticas e citocinas. (TRAPP; NAVE, 2008).

Danos e perdas de axônios são observados também na fase progressiva da doença, em neurônios desmielinizados, mesmo na ausência de um processo inflamatório. Ao contrário da fase aguda, na fase crônica, o sistema nervoso central já não possui mais uma capacidade renovatória significativa, e os sintomas são mais severos. Acontece, portanto, uma contínua atrofia do sistema nervoso central e perdas axonais, independentemente de inflamação. É interessante salientar que as perdas axonais não são apenas relacionadas à ausência da mielina, mas também à carência de fatores tróficos importantes. O efeito prejudicial da desmielinização no axônio é provavelmente devido às alterações em diversos aspectos fisiológicos, como no transporte de íons. (DUTTA; TRAPP, 2007; BJARTMAR; YIN; TRAPP, 1999).

Embora a esclerose múltipla seja uma doença comumente associada ao acometimento da substância branca, alguns de seus sintomas, como danos cognitivos específicos, são explicados por alterações patológicas na substância cinzenta. Ainda não se sabe ao certo o que de fato desencadeia os danos nesse local. Uma possibilidade é que eles ocorram como consequência da inflamação da substância branca, que resulta em carência energética para os neurônios e eliminação de substâncias potencialmente lesivas. Pode também ocorrer após inflamação nas meninges, que pode levar à desmielinização da camada cortical subpial como efeito colateral (GEURTS; BARKHOF, 2008). Um estudo com autópsias de pacientes detectou que as lesões na substância cinzenta profunda ocorrem como regiões de desmielinização ou através de neurodegeneração difusa. A desmielinização, principalmente no núcleo caudado e hipotálamo, pode ocorrer nas fases mais iniciais da doença e é relacionada à inflamação. Já os processos neurodegenerativos são representados por uma redução da densidade neuronal e presença de axônios danificados, o que contribui para sintomas neurológicos nos pacientes (HAIDER *et al*, 2014).

### **3.5 Aspectos imunológicos**

Normalmente a esclerose múltipla inicia-se com uma lesão aguda causada por linfócitos T CD4<sup>+</sup>, cujos receptores (TCR) são específicos para determinados antígenos da bainha de mielina. Eles chegam ao sistema nervoso central oriundos da periferia, onde foram estimulados por células apresentadoras de antígenos. Tais linfócitos são geralmente descritos como sendo Th1, secretores de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Porém, a importância dada às células Th17 tem aumentado nos últimos anos, visto que esse subtipo de linfócito tem sido encontrado no sistema nervoso central dos pacientes com a doença (WEINER, 2009). Esses linfócitos produzem a

citocina IL-17 (interleucina 17), e são células que chegam mais facilmente ao parênquima cerebral. (STROMNES et al, 2008).

As células apresentadoras de antígeno (APCs, *antigen presenting cells*) possuidoras do MHC de classe II apresentam epitopos protéicos para os linfócitos T auxiliares (Th). As células dendríticas (DCs), as APCs profissionais, atuam modulando o fenótipo dos linfócitos T virgens (*naive*, aqueles que ainda não foram ativados), além de estimular as células T efectoras a proliferarem e responderem aos seus antígenos específicos (McFARLAND; MARTIN, 2007). O próprio fenótipo da célula dendrítica também é importante para definir sua maneira de atuação. As DCs mielóides, através da secreção de TGF- $\beta$  (transforming growth factor- beta) e IL-6 (ou IL-23), polarizam a diferenciação dos linfócitos T CD4+ *naive* para um perfil Th17 (BAILEY *et al*, 2007), enquanto as DCs plasmocitóides têm um potencial estimulador menor, e ainda podem impedir a produção de citocinas inflamatórias pelos linfócitos T, atuando, portanto, de maneira reguladora (BAILEY-BUCKTROUT, 2008).

Os leucócitos circulantes precisam de algum estímulo que os tornem posicionados próximos à parede do vaso, ao invés de serem carregados pela corrente sanguínea. Isso pode ser mediado por moléculas de adesão da família das selectinas e por integrinas específicas, como a  $\alpha 4\beta 1$  (VLA-4, very late antigen-4), que se liga ao receptor carboidrato VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) e  $\alpha L\beta 2$  (LFA-1, *lymphocyte function-associated antigen-1*), ligante de receptores ICAMs (*intercellular adhesion molecules*) (ENGELHARDT, 2008; HOLMAN; KLEIN; RANHOSOFF, 2011). Na clínica já existe um tratamento para a esclerose múltipla através de anticorpos que depletam a porção  $\alpha 4$  da VLA-4, e em modelos animais essa integrina foi demonstrada como importantes na migração das células Th1 no sistema nervoso central, mas não Th17 (BETTELLI, 2013).

Em pacientes com esclerose múltipla, várias quimiocinas, bem como seus receptores, tem a expressão modificada. A análise de fluidos como o sangue e o líquido cefalorraquidiano e do próprio tecido nervoso permitiu observar o aumento dos níveis das quimiocinas CXCL9 e CXCL10, entre outras, e de seu receptor, CXCR3, que pode ser detectado na maioria dos linfócitos T. Já o receptor de CCL20, o CCR6, é mais citado em estudos experimentais sobre a esclerose múltipla. Em humanos doentes ele é relacionado com a migração de células encefalitogênicas para o sistema nervoso central, principalmente os linfócitos do tipo Th1 (ANDALIB *et al* 2011). Recentemente foi demonstrado que, em modelos animais, linfócitos Th17 e neutrófilos apresentam os receptores CXCR2, CCR6 e CXCR6 já na fase pré-clínica da

doença, e que a quimiocina CXCL1 estimula a migração de neutrófilos, ao passo que impede a das células Th17 (WOJKOWSKA, 2014).

Embora as células desencadeadoras da doença sejam do tipo Th (*T helper*), as alterações patológicas propriamente ditas são pouco relacionadas aos linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Uma das células mais envolvidas é o linfócito T expressando CD8, chamado de citotóxico. Ele tem a frequência aumentada nas lesões ocasionadas, sendo encontrado em grande quantidade nas proximidades de oligodendrócitos e axônios desmielinizados. Sua ação é dependente da secreção de perforinas e granzinas e da citocina IFN- $\gamma$ . (FRIESSE; FUGGER, 2009). Já o linfócito B ativado (plasmócito) é mais comum na fase crônica e, em alguns pacientes, imunoglobulinas e componentes do sistema complemento, ambos relacionados com a resposta humoral, predominam nas lesões (LASSMANN; BRUCK; LUCCHINETTI, 2007). A imunidade inata também é muito importante para a imunopatologia da doença. A micróglia por exemplo, que corresponde a cerca de 10% a 20% das células da glia, é considerada como um tipo de macrófago residente do sistema nervoso central. Outras células da imunidade inata também têm relativa importância na esclerose múltipla, como as células NK (*natural killer*), linfócitos T NK, mastócitos e linfócitos T portando o TCR do tipo  $\gamma\delta$  (cujos mecanismos de ação diferem daqueles utilizados pelos linfócitos T convencionais expressando o TCR $\alpha\beta$ ) (GANDHI; LARONI; WEINER, 2010).

É importante ressaltar que existem vários mecanismos imunorreguladores no organismo que contribuem para a manutenção da homeostasia, evitando as respostas imunes desreguladas, como as causadoras dos acometimentos autoimunes. Neste caso, os mais relevantes são os chamados processos ativos, em que é justamente uma resposta reguladora (e não a imunossupressão) a promotora da saúde para o indivíduo. Nesse contexto, destacam-se então as células conhecidas como reguladoras, principalmente os linfócitos T CD4<sup>+</sup>. O tipo mais conhecido (chamado de T<sub>reg</sub>) é a que expressa o fator de transcrição Foxp3 (*Forkhead box P3*). Esse fator de transcrição está associado com a expressão de vários genes, entre eles o da citocina anti-inflamatória IL-10 e de moléculas como CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*), um potente regulador negativo da resposta imune celular (FONTENOT *et al*, 2005). As células CD4<sup>+</sup> expressando o fator de transcrição Foxp3 foram descritas há mais de uma década como fundamentais para a manutenção da tolerância imunológica aos autocomponentes (HORI *et al*, 2003; SAKAGUCHI, 2005) e a deficiência genética desse fator está associada ao surgimento de vários distúrbios autoimunes que compõem o quadro clínico da IPEX (BENNETT *et al*, 2001).

O grupo de Howard Weiner descreveu, há alguns anos, um novo tipo de célula T reguladora produtora preferencialmente de TGF- $\beta$  (e IL10 em menor proporção), denominado de Th3. (CHEN *et al*, 1994, WEINER, 2001b). Além disto, essas células não expressam o fator de transcrição Foxp3, mas são capazes de induzir a diferenciação de células Treg CD4+CD25+Foxp3+ quando transferidas para camundongos (CARRIER *et al*, 2007). A ação imuno-reguladora da citocina TGF- $\beta$  já foi demonstrada em vários modelos experimentais de doenças e ela tem sido implicada nos mecanismos desencadeadores da tolerância oral (FARIA; WEINER, 2006a, WEINER *et al*, 2011). Mais recentemente, Nakamura e colaboradores descreveram células T CD4+ portadoras da forma de membrana de TGF- $\beta$  e a importância dessas células na imuno-regulação da colite experimental foi demonstrada por mais de um grupo (NAKAMURA; KITANI; STROBER, 2001; OIDA *et al*, 2003). Essa célula é caracterizada pela expressão da forma latente da citocina TGF- $\beta$  em sua membrana (associada ao peptídeo LAP, *latency associated peptide*), que posteriormente tem sua porção ativa clivada e secretada para o meio (OIDA *et al*, 2003). A ligação entre as células Th3 anteriormente descritas e o novo tipo celular expressando LAP na superfície ainda não é clara, mas tem sido proposto que as células T CD4+LAP+ seriam progenitoras das células Th3 (WEINER *et al*, 2011).

### **3.6 A encefalomielite autoimune experimental**

A encefalomielite autoimune experimental (EAE) é o modelo mais utilizado para representar reproduzir, em várias espécies de animais, os aspectos imunopatológicos da esclerose múltipla em humanos. Entretanto, por se tratar de um modelo experimental, algumas defasagens e imperfeições existem. Esse modelo experimental é induzido através da imunização de camundongos ou ratos com antígenos encefalitogênicos presentes na bainha de mielina, na presença de adjuvantes. O antígeno escolhido e a forma como as manifestações ocorrem dependem da linhagem do animal. (HART; GRAN; WEISSERT, 2011).

Em camundongos, os dois modelos mais frequentemente usados são o de relapso-remissão, em que a linhagem SJL é imunizada com o antígeno PLP (peptídeo 139-151 da *proteolipid protein*), e o crônico, com a imunização através da MOG (peptídeo 35-55 da *myelin oligodendrocyte glycoprotein*), em que uma fase de manifestações brandas é sucedida por um agravamento, cujo pico ocorre cerca de duas semanas após a imunização e tem duração de alguns dias. Posteriormente uma melhora incompleta dessas manifestações é observada e

essa remissão mantida por um período longo (HART; GRAN; WEISSERT, 2011). No modelo em que a MOG é utilizada na imunização de camundongos da linhagem C57BL/6, o tipo de resposta imunológica mais relevante para o desencadeamento das manifestações é a Th17. Em animais deficientes para essa citocina (IL-17), a doença é dificilmente induzida, bem como anticorpos que a bloqueiam impedem que ela seja desencadeada. Ao contrário, anticorpos bloqueadores da citocina IFN- $\gamma$ , e a deficiência de uma subunidade específica da IL-12 (ambas as citocinas são típicas de uma resposta Th1), acabam por agravar a doença. O IFN- $\gamma$  parece atuar inibindo o surgimento de células produtoras de IL-17, polarizando a resposta para um perfil Th1 (KOMIYAMA, *et al*, 2006).

Utilizando modelos de EAE, vários tratamentos imunoterápicos foram desenvolvidos e transferidos com sucesso para humanos com a esclerose múltipla. Dentre eles estão o acetato de glatirâmer, o Natalizumab, a mitoxantrona e o fingolimod. Entretanto, esses exemplos são mesclados com outros que não foram tão eficazes ou apresentaram efeitos colaterais ainda maiores, como o anticorpo anti-CD40L, cujo uso foi interrompido após a observação de complicações tromboembólicas; o TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ), que acabou induzindo uma sintomatologia semelhante a da própria esclerose múltipla; e o anticorpo que bloqueia uma subunidade comum às citocinas IL-12 e IL-23, que não apresentou eficácia no tratamento. Essa distância entre a EAE e a doença em humanos torna importante o estudo de algumas diferenças imunopatológicas entre a esclerose múltipla e seu modelo experimental (HART; GRAN; WEISSERT, 2011).

### **3.7 Tolerância oral**

A tolerância natural consiste nos mecanismos que o organismo possui, geralmente gerados a partir do timo, para manter a homeostase e evitar uma resposta imune desregulada contra o próprio, prevenindo assim doenças autoimunes (FARIA; WEINER, 2006b). Nesse contexto, a mucosa intestinal apresenta-se como um ambiente propício (de alguma maneira análoga ao do timo) para permitir a indução e manutenção da tolerância imunológica a antígenos que sejam apresentados pela via oral. A utilização da via da mucosa intestinal para a indução de tolerância, portanto, é denominada tolerância oral. O termo foi utilizado pela primeira vez nos anos 70, sendo classificado como uma supressão específica da imunidade humoral e/ou celular para antígenos administrados pela via oral (VAZ *et al*, 1977).

A mucosa intestinal representa a maior área do organismo de contato com o meio ambiente. Trata-se de uma única camada de células epiteliais absorptivas, fazendo a interface entre o lúmen (ambiente externo) e a lâmina própria (ambiente interno). Dessa perspectiva, pode-se inferir que a anatomia da mucosa intestinal não é propícia para que ela aja como uma barreira estrita, mas sim para funcionar de forma a permitir a absorção de nutrientes, e concomitantemente abrigar trilhões de microorganismos comensais. A microbiota, bem como os cerca de 30 Kg de proteínas ingeridos em média por indivíduo durante um ano, constituem as principais fontes de antígenos que o GALT (*gut associated lymphoid tissue*) entra em contato. Somente um local com características fisiológicas e imunológicas tão peculiares pode conviver com essa vasta gama de antígenos em condições tolerogênicas (REIS, MUCIDA, 2011; WEINER *et al*, 2011).

O tecido linfóide associado à mucosa intestinal é complexo, com órgãos linfóides secundários e células organizadas de uma maneira peculiar. No intestino, são encontrados os linfonodos mesentéricos (os maiores do organismo). Eles fazem um intercâmbio entre o GALT e a circulação periférica e são sítios importantes para a expansão de células T reguladoras e para a indução de tolerância oral (WORBS *et al*, 2006, SCHULZ *et al*, 2009, PABST; MOWAT, 2012). Já a lâmina própria contém células B e T com uma frequência similar à encontrada nos órgãos linfóides periféricos, e esses linfócitos B, uma parte deles da subpopulação de células B1, produzem grande quantidade da imunoglobulina A secretória (sIgA) (REIS; MUCIDA, 2011; WEINER *et al*, 2011).

De modo geral, diz-se que a entrada de altas doses do antígeno na mucosa induz uma tolerância mediada primariamente por anergia ou deleção, enquanto o contato com pequenas doses induz uma tolerância mais ativa, através de células T reguladoras (FARIA; WEINER, 2005). Nesse último caso, experimentos em animais têm demonstrado que a ingestão contínua de antígeno, em detrimento de ingestões únicas, periódicas ou induzidas (gavagens) é mais eficiente para a indução da tolerância oral (FARIA *et al*, 1998), como no caso da indução da tolerância à ovalbumina (OVA) e a proteína MBP (*myelin basic protein*), em que esse mecanismo mostrou ser o mais eficiente para aumentar níveis de IL-10 e TGF- $\beta$  (FARIA *et al*, 2003).

A tolerância oral tem sido utilizada com sucesso em diversos modelos experimentais. Em estudos sobre artrite, colite, aterosclerose e diabetes, a ingestão de determinados antígenos, justamente aqueles responsáveis por induzir uma resposta patológica (visto que são doenças

autoimunes), previnem as manifestações, quando o organismo é posteriormente desafiado com esse mesmo antígeno, por outra via (FARIA; WEINER, 2006b). No caso da EAE, os primeiros resultados obtidos com sucesso foram em 1988, com o antígeno MBP, em ratos de Lewis (KHOURY *et al*, 1990; BROD, *et al* 1991). Posteriormente, outras linhagens e antígenos foram testados. No caso da MOG, sua ingestão anteriormente à imunização de camundongos C57BL/6 promove uma redução da resposta Th17, responsável pelo desencadeamento da doença, bem como de outras citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, impedindo, assim, as manifestações da EAE (PERÓN *et al*, 2010).

### **3.8 As proteínas de choque térmico**

A classe de proteínas conhecida como proteínas de choque térmico engloba moléculas amplamente liberadas em eventos inflamatórios. Possuem seus genes codificantes altamente conservados sendo encontrados em todas as espécies pesquisadas até hoje. Tais genes, bem como seus produtos, são classificados em famílias de acordo com a homologia nas sequências e tamanho molecular. Portanto, as Hsps (*heat shock proteins*) são denominadas HSP 10, HSP60, HSP70, HSP90, HSP100, entre outras (FEDER; HOFMANN, 1990).

As HSPs funcionam como chaperonas moleculares, e tem sua ação aumentada em condições de estresse celular, como o aumento da temperatura, o que justifica sua nomenclatura. Ao interagirem com proteínas que não estão apresentando sua conformação nativa, reduzem a probabilidade dessas exercerem efeitos inadequados sob outras proteínas. (FEDER; HOFMANN, 1990). Das propriedades mais interessantes das HSPs podemos citar as envolvidas com as respostas imunológicas do organismo. A própria função de chaperona confere a essas proteínas características importantes no contexto imunológico, porque elas podem se ligar a peptídeos antigênicos produzidos no citosol e transportá-los até a fenda do MHC-I, além de promover a apresentação cruzada, em que peptídeos são levados por ela para fora da célula, e o complexo chaperona-epitopo é apresentado pelo MHC-I (TSAN; GAO, 2009).

A HSP60 é uma das proteínas de choque térmico mais estudadas, principalmente no que diz respeito a sua relação com o sistema imune. O HSP60 por si só é capaz de sinalizar com receptores da imunidade inata, como o TLR4 (*Toll like receptor 4*) de macrófagos, células dendríticas e monócitos, sendo que esses últimos passam por maturação e ativação após a sinalização induzida pelo HSP60, resultando na produção de citocinas pró-inflamatórias

(QUINTANA; COHEN, 2010). Ao contrário, a ligação de TLR2 dos linfócitos T reguladores pela HSP60 leva ao aumento da capacidade reguladora dessas células, pois elas tornam-se mais eficientes na inibição da secreção de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  pelas células efectoras (nesse caso, consideradas como não regulatórias), e as próprias células reguladoras passam a expressar níveis mais elevados de IL-10 e TGF- $\beta$  (ZANIN-ZHOROV *et al*, 2006).

A ação das proteínas de choque térmico no sistema imune pode em parte ser explicada pelo fato delas serem antígenos imunodominantes, como proposto por Irun Cohen (COHEN; YOUNG, 1991). Através de uma teoria denominada “Homunculus imunológico” (fazendo referência ao homunculus neurológico, em que o corpo humano é representado proporcionalmente à importância que cada parte tem para o sistema nervoso), esse autor propõe que alguns antígenos próprios seriam os principais responsáveis pela organização estrutural do sistema imunológico. Dentre tais antígenos estão, portanto, as proteínas de choque térmico, por serem altamente presentes no organismo, tanto em condições fisiológicas quanto de estresse, além de serem muito presentes no contexto de apresentação antigênica no timo. O organismo saudável, portanto, é povoado com células T e B reativas a antígenos próprios, entre eles as HSPs (COHEN, 2007). Dentre essas células, destacam-se as T reguladoras, sendo muitas delas naturais e formadas no timo. Tais propriedades imunológicas das proteínas de choque térmico as tornaram objetos de estudos em vários modelos de doenças, principalmente as autoimunes.

Resultados positivos foram alcançados em modelos de artrite, aterosclerose, asma, diabetes tipo I, entre outros, quando a HSP60 foi administrada por diversas vias (oral, nasal, intraperitoneal e subcutânea), dependendo do modelo (COELHO; FARIA, 2012). Em modelos de obesidade induzida por dietas hipercalóricas foram observados aumento na frequência de anticorpos específicos para o HSP60, e o tratamento com certas proteínas derivadas do HSP60 (injetadas subcutaneamente) melhorou os níveis de colesterol e preveniu resistência à insulina (SELLI *et al*, 2017). Já culturas *in vitro* de células da micróglia, quanto tratadas com IL-1 $\beta$ , têm maior liberação de HSP60 no meio, e este, através da ligação ao TLR4, estimula a fosforilação de fatores de transcrição com caráter inflamatório (SWAROOP *et al*, 2016). Favorecendo ao papel imunorregulador do HSP65, foi visto que leucócitos provenientes tanto de indivíduos saudáveis quanto com tuberculose, quando estimulados com DNA codificador de HSP65 ou com o próprio peptídeo purificado, têm aumentados os níveis de IL-10 (WOWK, P.F *et al*, 2017).

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Estudar o efeito da administração oral com *Lactococcus lactis* produtor de HSP65 no tratamento da encefalomielite autoimune experimental, bem como os mecanismos envolvidos nos efeitos observados.

### 4.2 Objetivos específicos

- Testar, através do índice macroscópico, o efeito da administração oral do *L.lactis* produtor de HSP65 durante o curso da EAE; e em caso afirmativo, até qual dia após a imunização o início do tratamento ainda é eficiente;
- Avaliar nesses animais:
  - o perfil celular dos leucócitos presentes nos órgãos linfóides dos animais tratados, identificando células reguladoras e efetoras
  - o processo de migração de leucócitos para a medula espinhal, quantificando e fenotipando as células que chegam na medula espinhal, correlacionando ao índice macroscópico;
  - confirmar se de fato o efeito do tratamento é através de um mecanismo imunorregulatório, e não imunossupressivo.

## 5. METODOLOGIA

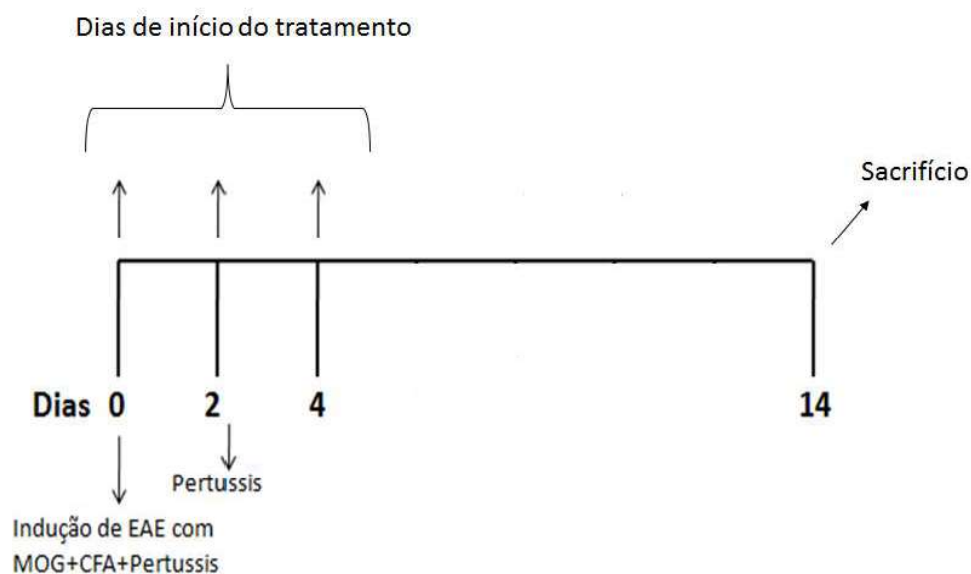
### 5.1 Animais

Camundongos C57BL/6 Foxp3-GFP (*green fluorescence protein*) *knock-in* foram gentilmente doados pelo Dr. Howard L. Weiner (Center for Neurologic Diseases e Brigham and Women's Hospital, Boston, MA, USA). Também foram utilizados camundongos C57BL/6 provenientes do CEBIO (Centro de Bioterismo) da UFMG. Para os experimentos, foram utilizadas apenas fêmeas, entre 6 e 8 semanas de vida, mantidas em gaiolas coletivas durante o experimento. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG.

### 5.2 Desenho experimental

Camundongos fêmeas C57BL/6 Foxp3-GFP, entre 6 e 8 semanas de vida, foram imunizados para a indução da EAE. No dia da imunização, e nos dias 2 e 4 após a indução da EAE, começaram a receber por via oral *ad libitum* durante 5 dias meio de cultura, *Lactococcus lactis* contendo plasmídeo não codificante (cepa controle) e *Lactococcus lactis* com plasmídeo produtor de HSP65. O meio contendo a bactéria foi trocado diariamente. Por fim, no 14º dia após a imunização foram sacrificados para a realização de análises diversas. O desenho experimental ocorreu conforme demonstrado na figura 1.

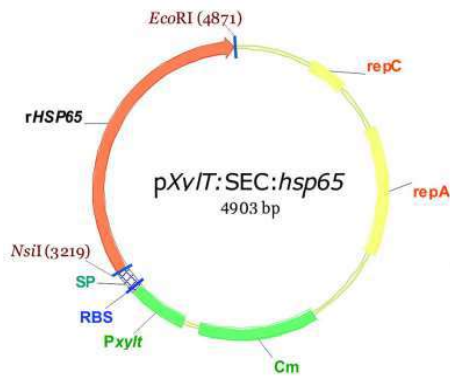
Obs: como verificamos a eficiência do tratamento iniciando nos pontos indicados, o tratamento será iniciado também em dias posteriores, em que o índice clínico é mais alto, para testar a eficácia do mesmo.



**Figura 2: Desenho experimental.**

### 5.3 Obtenção das linhagens bacterianas

As cepas utilizadas nesse trabalho foram obtidas e geneticamente modificadas em colaboração com o Dr. Anderson Miyoshi, do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, conforme descrito por Azevedo e colaboradores (AZEVEDO, M.S *et al*, 2012). O *Lactococcus lactis* NCDO2118 teve adicionado um plasmídeo codificador de HSP65 (pXyIT:SEC:Hsp65) ou um não codificante (pXyIT:SEC). Foi utilizado um sistema da expressão do plasmídeo através de xilose e a proteína produzida é idêntica à de *Mycobacterium leprae*. Foi estimado por *Western Blotting* que *L. lactis* pSEC (produtor de HSP na forma secretada) produz 7µg/mL de Hsp65, após indução de crescimento da cepa e da expressão do plasmídeo, como descrito no próximo item. Além disso, como o *Lactococcus* é uma bactéria Gram-positiva, a HSP65 produzida por *L. lactis* é livre de endotoxinas como o lipopolissacarídeo (LPS).



AZEVEDO, M.S *et al*, 2012

**Figura 3: representação esquemática do vetor de HSP65 com sistema de expressão extracelular induzido por xilose.** PxyIT = promotor de indução por xilose; RBSUsp45 = região do ribossomo ligante de Usp45; rHsp65 = sequência codificadora do hsp65 recombinante; Cm = resistência ao cloranfenicol; SP = peptídeo sinal; repA e repC = origem de replicação; EcoRI e NsiI = enzimas de restrição.

#### 5.4 Crescimento das cepas e indução da expressão do plasmídeo

O processo de crescimento das cepas bacterianas com posterior indução da proteína pelo plasmídeo foi realizado em dois dias, com duração total de 42 horas.

**Primeiro dia:** colônias individuais de *L.lactis* NCDO2118 abrigando os vetores pXyIT:SEC:Hsp65 ou pXyIT:SEC foram cultivadas em meio M17 (Difco), com a adição de 0,5% de glicose e 10 µg/mL do antibiótico cloranfenicol (Sigma). O meio de cultura com as cepas foi mantido em estufa a 30°C, sem agitação, por 18 horas.

**Segundo dia:** As culturas crescidas *overnight* foram diluídas (1:10.000) em 10 mL de XM17. Xilose a 1%, utilizada para induzir a expressão do plasmídeo geneticamente modificado, foi adicionada tanto na cepa contendo pXyIT:SEC:Hsp65 quanto na que continha pXyIT:SEC, para melhor controle do experimento. Adicionou-se também 10 µg/mL de cloranfenicol (Sigma). O meio de cultura cepa foi mantido em uma estufa a 30°C, sem agitação, por 24 horas.

#### 5.5 Administração do *Lactococcus lactis* por via oral

Após a indução da expressão de HSP65 pelo plasmídeo geneticamente modificado, os meios de cultura contendo o *L.lactis*, com ou sem HSP65 no sobrenadante, puderam então ser administrados por via oral. Foram acondicionados em mamadeiras de vidro estéreis e o

procedimento foi feito por 5 dias consecutivos, com as mamadeiras sendo trocadas diariamente. Como cada animal ingeriu em média 5ml da cultura por dia, contendo aproximadamente 7µg/mL de HSP65 no sobrenadante, foi estimada uma ingestão diária de 35µg da proteína. Entretanto, como bactérias vivas são administradas, uma quantidade significativa provavelmente pode chegar ao trato gastrointestinal em condições de liberar a proteína, o que permite supor que a quantidade real da HSP65 que chega à mucosa intestinal do animal é maior que a calculada.

## **5.6 Indução da encefalomielite autoimune experimental**

Camundongos C57BL/6 Foxp3-GFP foram imunizados na base da cauda, subcutaneamente, com 100µg do peptídeo proveniente da MOG (*myelin oligodendrocyte glycoprotein*), MOG<sub>35-55</sub> (Proteimax), sequência MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK. O peptídeo foi injetado em uma emulsão de adjuvante completo de Freund (CFA, *complete Freund adjuvant*) contendo 4mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (Difco). No dia da imunização e 48 horas após, foi injetada intraperitonealmente uma solução contendo 300ng de toxina *pertussis* (Sigma).

## **5.7 Índice macroscópico**

O índice macroscópico (índice clínico) foi realizado do 1º até o 14º dia após a imunização. Consiste de análises de parâmetros clínicos, em que as manifestações da doença foram observadas, classificadas e quantificadas. Dessa forma, teve-se que: 0 pontos correspondeu a nenhuma manifestação da EAE; 0,5 (paralisação parcial da cauda); 1 (paralisação da cauda ou mudança no padrão da caminhada); 1,5 (paralisação parcial da cauda e mudança no padrão da caminhada); 2 (paralisia da cauda e mudança no padrão da caminhada); 2,5 (paralisia parcial de uma pata); 3 (paralisia de uma pata); 3,5 (paralisia de uma pata e paralisia parcial de outra). 4 (paralisia completa das patas traseiras); 4,5 (paralisia completa das patas traseiras e parcial das dianteiras); 5 (animal praticamente sem movimento).

## 5.8 Histologia

As medulas espinhais e cérebros dos animais tratados com meio e com *L.lactis* produtor de HSP65 foram extraídas no 14º dia após a imunização. Os animais utilizados para a histologia foram aqueles em que o tratamento foi iniciado no 4º dia após a imunização. A fixação foi através de uma solução contendo 20% de dimetilsulfóxido e 80% de metanol, por 6 dias a -80°C, e 24 horas à -20°C. A medula espinhal foi então acondicionada em Paraplast®, sendo que pedaços de 5µm foram cortados e corados com hematoxilina e eosina. As secções foram avaliadas quanto às modificações histopatológicas, como infiltrado inflamatório e lesões na substância branca. Foi utilizado um microscópio ótico (Olympus BX41) e uma câmera (Moticam 2500) para a obtenção das imagens. Para a quantificação das células, usou-se do programa ImageJ, em que campos de visão de cortes histológicos representativos foram analisados.

## 5.9 Extração de células para citometria de fluxo

Os órgãos linfóides secundários analisados nesse trabalho (baço e linfonodos mesentérico, inguinal e cervical) foram extraídos de camundongos com tratamentos iniciados em dias diferentes (no dia da imunização e 2 e 4 dias após), mas sempre com o sacrifício realizado no dia 14 após a indução da EAE. As suspensões das células foram homogeneizadas e centrifugadas a 1200rpm por 10 minutos sob refrigeração a 4°C. A lise de hemácias do baço foi feita com PBS 10X diluído 1:10 em água. Posteriormente, as células foram novamente centrifugadas e ressuspensas em RPMI 1640 (GIBCO BRL) acrescido de 10% de soro fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 20 µg/mL de sulfato de gentamicina, 25 mM de HEPES (Sigma, St. Louis, Missouri) e 50µM de β-mercaptoetanol (Amersham Pharmacia Biotech), pH 7,2. As células foram contadas no microscópio ótico, com câmara de Neubauer.

## 5.10 Citometria de fluxo

Células isoladas dos órgãos foram plaqueadas em uma quantidade aproximada de  $1 \times 10^6$ . Em seguida, foram adicionados 10µl por poço do coquetel de anticorpos monoclonais anti-marcadores fenotípicos conjugados com PE (ficoeritrina), Cy5 (Cy-chrome), PerCP Cy5.5, APC (aloficocianina), Alexa-647 ou biotina. As células foram incubadas por 30 minutos a 4°C,

no escuro. Posteriormente, elas foram lavadas com 100µl por poço de PBS-BSA-NaN<sub>3</sub> e centrifugadas a 1200 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e, então, o procedimento de lavagem foi novamente repetido. Posteriormente, as células marcadas com anticorpo biotina foram submetidas a uma nova incubação (30 minutos) com estreptavidina-Cy5.5 e lavadas mais 2 vezes, conforme descrito. Finalmente, as células marcadas foram ressuspensas em 200µl de solução fixadora (0,5% de formaldeído em PBS1X) e mantidas a 4°C, no escuro até o dia seguinte. Os anticorpos utilizados foram: anti-CD4 (APC e PerCp Cy5.5); anti-LAP (PE); anti-CD44 (PE ou Alexa-647) e anti CD62-L (biotina). A leitura foi feita usando o FACScan ou FACScalibur (Beckton Dickinson, Mountain View, Califórnia), e as análises através do programa FlowJo (Tree Star Inc).

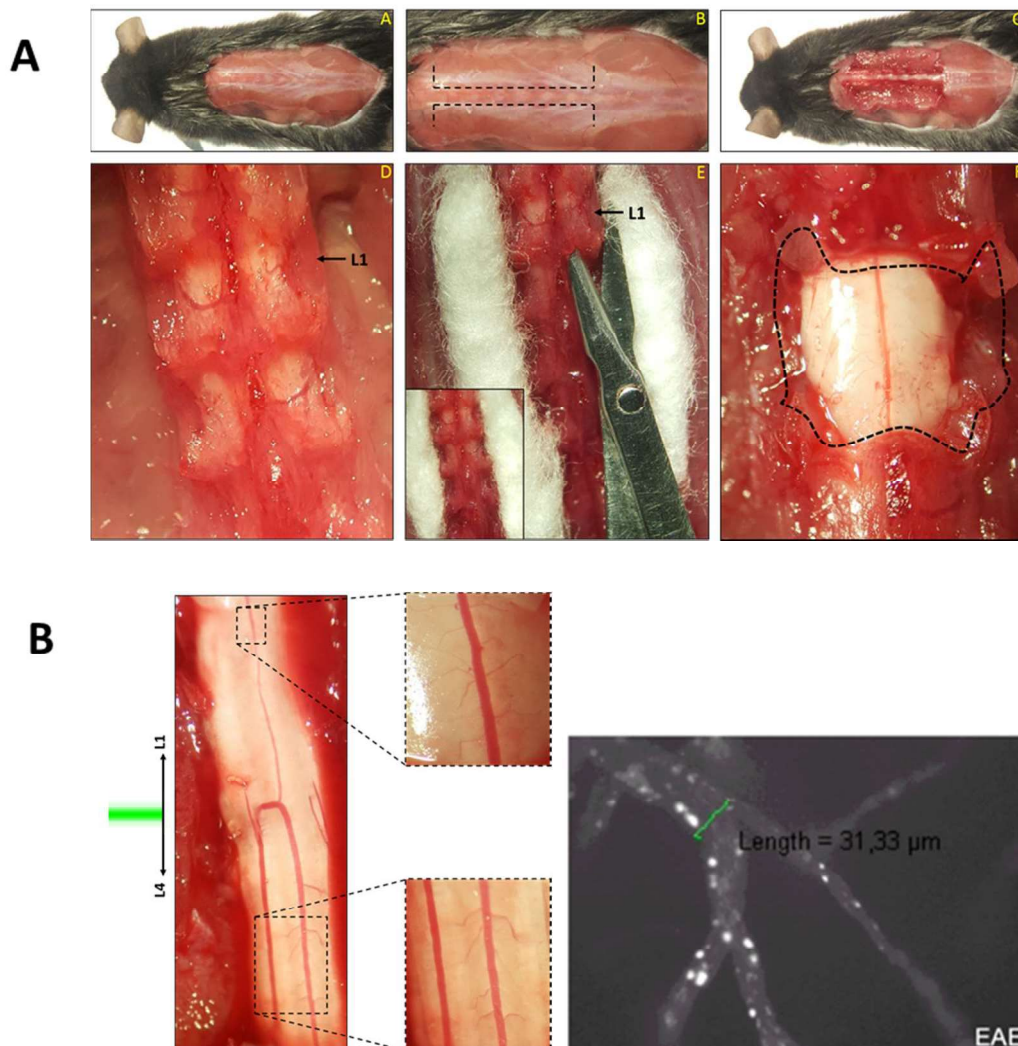
### **5.11 Microscopia intravital**

As técnicas de imagens foram realizadas em colaboração com a professora Vanessa Pinho da Silva e o estudante de doutorado William Antônio Gonçalves, do laboratório de Imunofotobiônica da UFMG. Para o experimento foram utilizados os camundongos C57BL/6 em que o tratamento foi iniciado no 4º dia após a imunização. O ponto escolhido para o sacrifício foi o 14º dia após a imunização. Para avaliação do rolamento e adesão dos leucócitos nos vasos da medula espinhal, os animais foram submetidos à técnica de microscopia intravital.

Para aplicação deste método, os animais receberam uma injeção intraperitoneal (i.p.) (100µl/ animal) de uma mistura contendo quetamina (37,5 mg/ ml) e xilazina (2,5 mg/ml). Tal solução não provoca alterações hemodinâmicas que poderiam prejudicar a avaliação dos processos de recrutamento de leucócitos. Após a injeção, os animais foram submetidos a uma cirurgia para remoção dos músculos vertebrais, desde a região torácica até a região lombar, de forma que as vértebras ficassem aparentes. Para exposição da medula espinhal foi realizada uma laminectomia. Este procedimento se deu através de incisões nas laterais de cada vértebra (L1- L5), posterior aos processos transversos. A cada incisão em cada vértebra, a mesma era rebatida e removida em seguida, revelando os vasos da superfície dorsal da medula espinhal (fig.4.a) Para realização do procedimento cirúrgico descrito acima, os animais foram gentilmente posicionados em uma placa térmica, a 37°C, mantendo estável a temperatura dos camundongos.

Uma vez que a região dorsal da intumescência lombar da medula espinal foi exposta, os animais receberam uma injeção intravenosa (i.v.) de Rhodamina 6G-Sigma (0.5 mg/kg), marcando os leucócitos que foram identificados através da emissão de fluorescência. Em seguida, os animais foram posicionados em um microscópio intravital (Nikon C- SRS H550L; Japan) utilizando uma lente objetiva de 20X para visualização dos leucócitos na microvasculatura da medula espinal. A imagem foi projetada em um monitor de computador através de uma câmara digital (Nikon DSQIMC; Japan) acoplada ao microscópio, gravadas e posteriormente analisadas usando o programa Imaging software (NIS ELEMENTS- NIKON).

O rolamento de leucócitos foi definido como sendo células se movendo em menores velocidades que as de eritrócitos dentro do vaso analisados. O número de células rolando foi determinado pela contagem de células passando por um ponto marcado no vaso por minuto. Foram considerados leucócitos aderentes aqueles que permaneciam imóveis por no mínimo 30 segundos, e quantificados dentro de um comprimento de 100  $\mu\text{m}$  do vaso avaliado (fig 4.b). A metodologia de utilização desse microscópio de confocal para técnicas de intravital foi descrita por Pedro Elias Marques e colaboradores, em 2015 (MARQUES *et al*, 2015).



**Figura 4: Microscopia intravital. (A):** Detalhamento da laminectomia para exposição dos microvasculatura da região dorsal da intumescência lombar da medula espinhal. Preparo da região toraco-lombar submetida ao processo cirúrgico (A e B). Músculos da região toraco-lombar removidos (C) para visualização das vertebras (D). Local de Incisão para laminectomia da região pósterolateral da 1ª vertebra lombar (E). Vasos dorsais da medula espinhal abaixo da 1ª vertebra lombar (F). **(B):** Região dorsal da intumescência lombar da medula espinhal. Microvasculatura passível de visualização pela técnica de microscopia intravital. A visualização da região inclui campos mais próximos da superfície da medula espinhal abaixo da 1ª vértebra lombar (imagem ampliada superior à direita) até superfícies próximas e abaixo da 4ª vértebra lombar.

### **5.12 Análises estatísticas**

O Teste t de Student foi utilizado para comparações entre dois grupos experimentais. Utilizou-se a análise de variância (ANOVA), com o teste de Tukey, para calcular a significância entre três grupos.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 A administração oral do *Lactococcus lactis* produtor de HSP65 reduziu os sinais clínicos da EAE

Primeiramente os camundongos C57BL/6 Foxp3-GFP tiveram o tratamento oral iniciado no mesmo dia da indução da EAE. Os animais que, no dia da imunização, receberam meio contendo *L.lactis* produtor de HSP65 inicialmente tiveram índices clínicos (parâmetros descritos no item 4.7) comparáveis aos dos animais que só receberam meio de cultura M17 ou bactérias contendo plasmídeos vazios. Foi verificado que somente os animais que receberam a cepa produtora de HSP65 tiveram o índice clínico da doença reduzido, enquanto os dois outros grupos não apresentaram diferenças entre si.

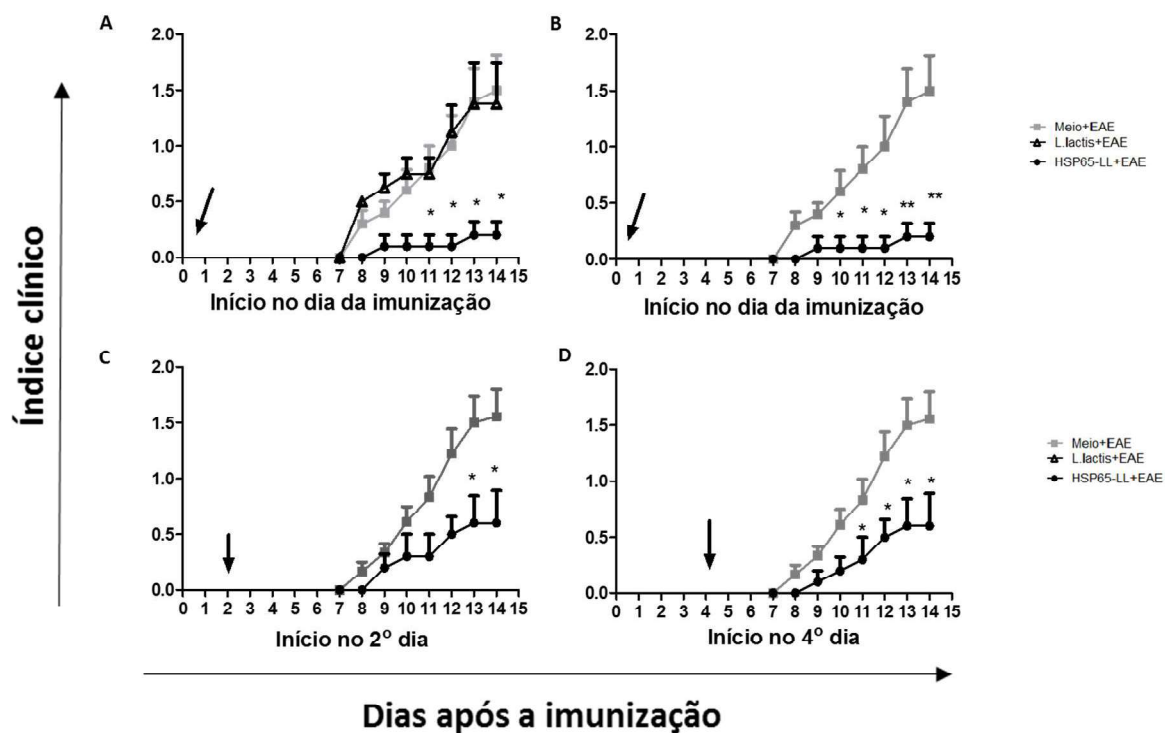


Figura 5: A administração oral do *Lactococcus lactis* produtor de HSP65 trata os sinais clínicos da EAE. Camundongos C57BL/6 Foxp3/GFP foram imunizados para a indução de EAE. O índice clínico foi acompanhado até o 14º dia após a imunização. Os animais ingeriram por cinco dias apenas meio (grupo “Meio+EAE”), meio com *L.lactis* não codificante (“*L.lactis* + EAE”) ou meio com *L.lactis* produtor de HSP65 (“HSP65-LL+EAE”). Foram utilizados 5 animais em cada grupo. O curso da EAE é demonstrado pela média do índice clínico de cada

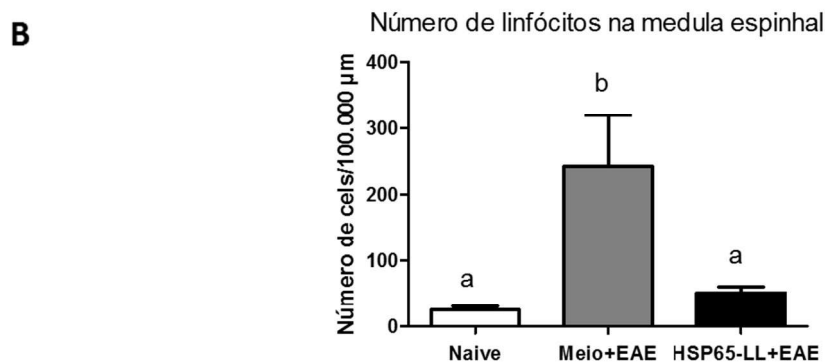
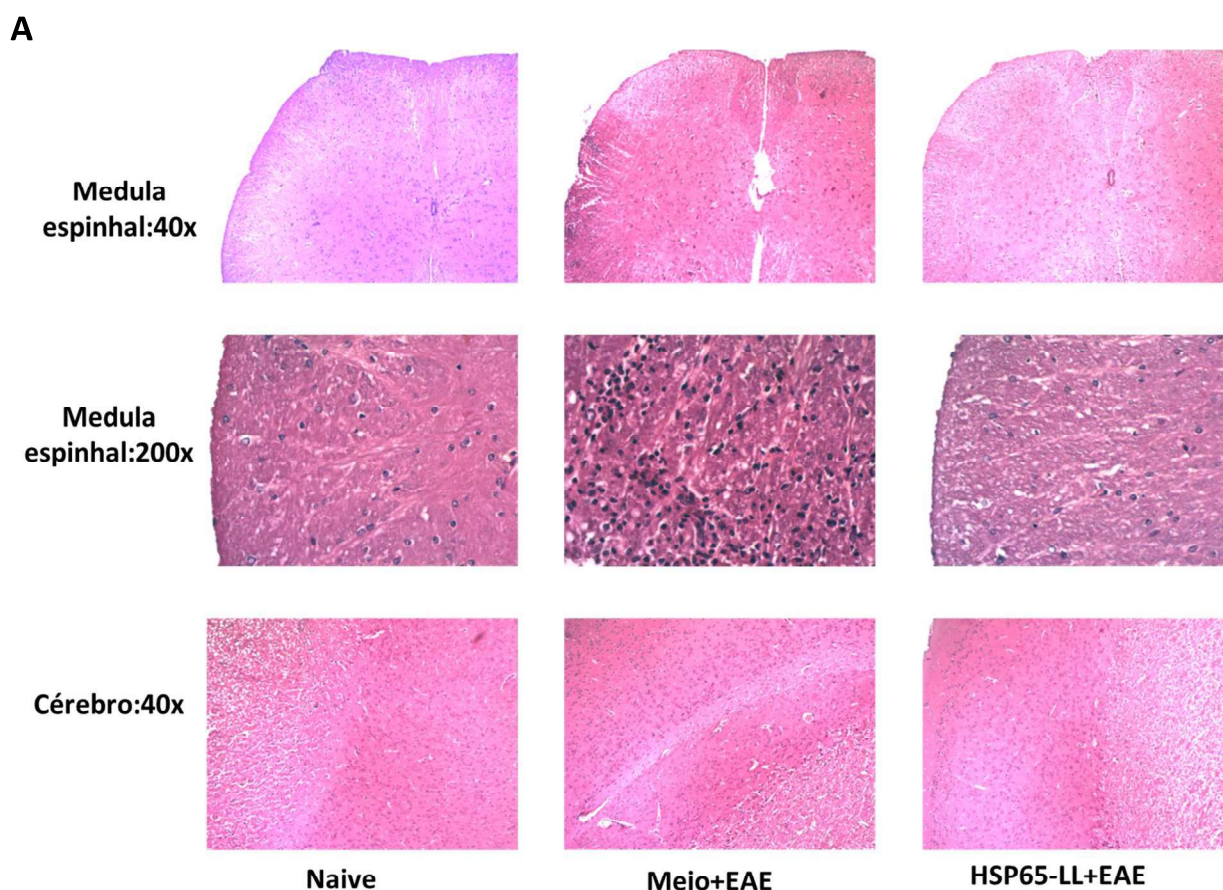
animal  $\pm$  padrão. A significância da diferença entre os grupos foi calculada pelo teste t de Student (B, C, D) e por ANOVA com pós teste Tukey (A). \* Representa  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,1$ ; \*\*\*  $p < 0,01$ .

(A): Tratamento iniciado no dia da imunização. Nesse caso, utilizou-se também o controle *L.lactis* + EAE. As diferenças obtidas são entre o grupo HSP65-LL+EAE e os outros dois. (B): tratamento iniciado no dia da imunização, mas com análises estatísticas excluindo o grupo *L.lactis* + EAE. (C): tratamento iniciado no 2º dia após a imunização. (D): tratamento iniciado no 4º dia após a imunização.

Como a administração de *L.lactis* contendo o plasmídeo vazio não resultou em mudanças no curso da doença, nos experimentos preliminares assim como naqueles experimentos em que a administração das bactérias foi realizada antes da indução da doença (Rezende et al, 2013), nos demais experimentos (em que animais tiveram o tratamento oral iniciado nos dias 2 e 4 após a imunização), não utilizamos mais o controle com as cepas não produtoras de HSP65, mas apenas meio de cultura. Em todos os pontos de cinética testados, o tratamento oral com o *L.lactis* produtor de HSP65 mostrou-se eficiente para tratar os sinais típicos da EAE, reduzindo assim o índice clínico.

## **6.2 O tratamento com o *L.lactis* produtor de HSP65 reduziu os sinais inflamatórios no sistema nervoso central**

Lâminas histológicas foram utilizadas para analisar as alterações inflamatórias no sistema nervoso central. Como esperado, a medula espinhal foi o órgão mais afetado no modelo de encefalomielite autoimune experimental; significativamente mais alterado que o cérebro principalmente com relação à presença de infiltrado de leucócitos no local. Entretanto, foi observado que animais com o tratamento com *L.lactis* produtor de HSP65 iniciado no 4º dia após a indução da doença apresentam um menor número de linfócitos quando comparado ao grupo que recebeu apenas meio M17 (grupo Meio+EAE), comparável ao número apresentado pelo grupo naíve no 14º dia após a imunização. Enquanto no grupo controle é possível ver um infiltrado linfocitário bastante significativo, nos outros os tipos celulares mais observados são células da glia e neurônios residentes. Já no cérebro não se observou diferenças significativas entre os grupos.

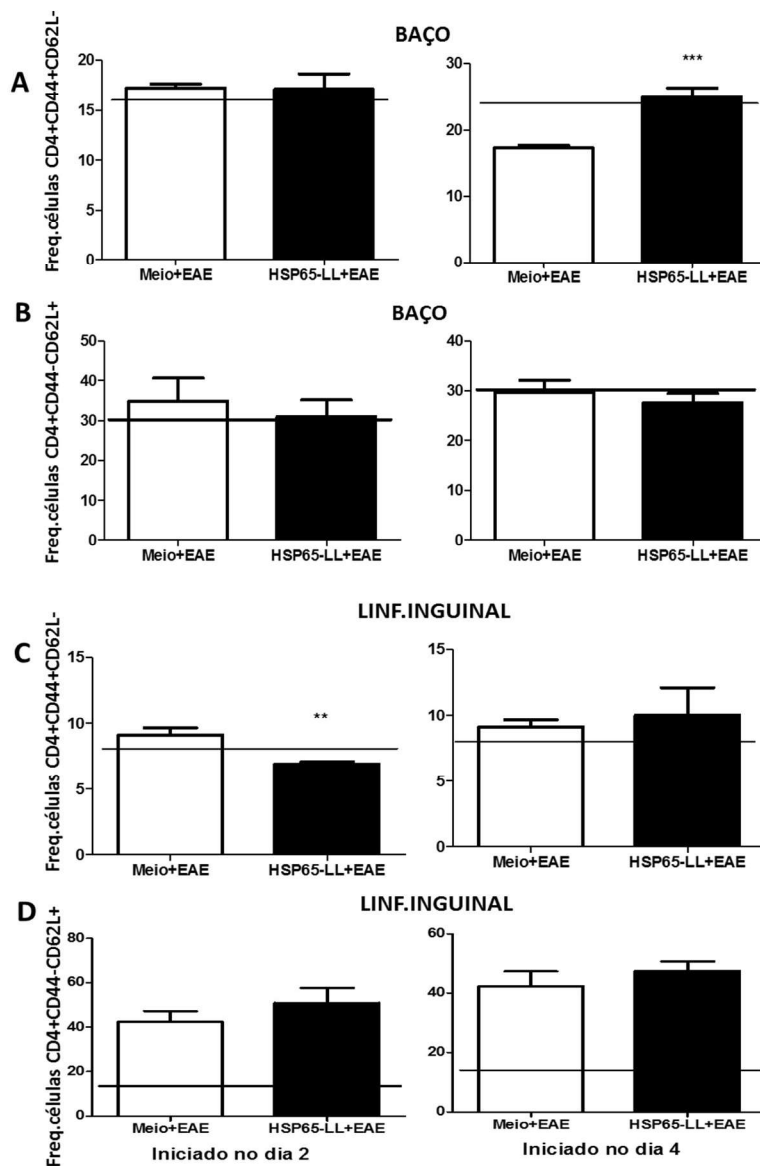


**Figura 6: O tratamento com o *L.lactis* produtor de HSP65 reduz os sinais inflamatórios no sistema nervoso central.** Camundongos C57BL/6 foram imunizados para a indução de EAE. Os animais ingeriram por cinco dias apenas meio (grupo “Meio+EAE”) ou meio com *L.lactis* produtor de HSP65 (“HSP65-LL+EAE”). O tratamento foi iniciado no 4º dia após a imunização O sacrifício foi no 14º dia após a indução da doença. Foram utilizados 5 animais em cada grupo. (A): Secções transversais representativas do cérebro e medula espinhal, com o aumento descrito na legenda. (B): contagem de linfócitos na substância branca da medula espinhal, utilizando-se o aumento de 200x. As letras indicam semelhanças ou diferenças entre os grupos. As significâncias foram calculadas pelo teste ANOVA com pós-teste Tukey.

### **6.3 O tratamento com *L.lactis* produtor de HSP65 alterou o perfil de ativação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> nos órgãos linfoides**

Os fenômenos imunológicos são em grande parte relacionados ao perfil de ativação das células envolvidas. No caso da encefalomielite autoimune experimental, em que as células T CD4<sup>+</sup> são as desencadeadoras da doença, tornou-se essencial observar o fenótipo dessas células quanto à ativação. Em linhas gerais, é dito que duas moléculas são importantes para definir o status de ativação dos linfócitos T: o CD62L (selectina-L) é uma molécula de adesão, que atua como um receptor de migração, auxiliando a entrada dos linfócitos nos órgãos linfoides secundários. Já o CD44 (receptor de ácido hialurônico) é uma glicoproteína de superfície envolvida na ativação linfocitária e entrada dos linfócitos no parênquima tecidual. Portanto, as células CD4<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup> podem ser tratadas como células *naive*, que não recirculam e ficam retidas nos órgãos linfoides; enquanto as células CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> são consideradas células efetoras e recirculantes, que chegam aos tecidos (HU *et al*, 2008).

Nossa hipótese é que o efeito do tratamento oral com o *L.lactis* produtor de HSP65 poderia influenciar a ativação de linfócitos T envolvidos no desenvolvimento da doença. Foram analisados quatro órgãos: baço, linfonodo cervical, linfonodo inguinal e linfonodo mesentérico. As células foram extraídas de animais cujos tratamentos foram iniciados em dias distintos após a imunização (0, 2 e 4) e posteriormente foram analisadas por citometria de fluxo, no 14º dia após a imunização. No baço, o tratamento com o *L.lactis* produtor de HSP65 a partir do 4º dia após a imunização manteve a frequência dos linfócitos possivelmente ativados (CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD62<sup>-</sup>). Já no linfonodo inguinal, com o tratamento iniciando no 2º dia após a imunização, a frequência dessas células reduziu. Interessantemente, o tratamento iniciado no dia da indução da doença, embora tenha tido efeito muito relevante no índice clínico, não alterou o perfil de ativação celular em nenhum órgão testado. Na figura 5, estão representadas as frequências de linfócitos T ativados dentro da população CD4<sup>+</sup> em todos os momentos e nos órgãos onde houve diferenças.



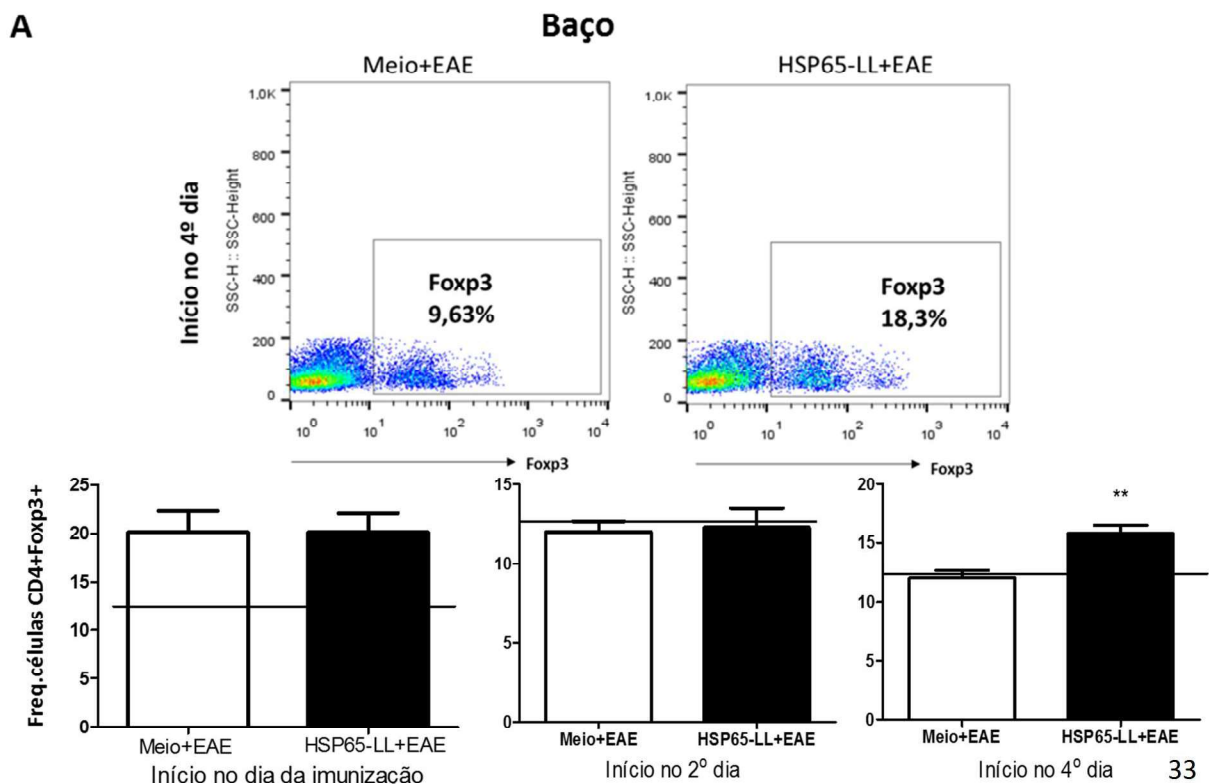
**Figura 7: Perfil de ativação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> nos órgãos linfóides:** Camundongos C57BL/6 Foxp3/GFP foram imunizados para a indução de EAE. Os animais ingeriram por cinco dias apenas meio (grupo “Meio+EAE”) ou meio com *L.lactis* produtor de HSP65 (“HSP65-LL+EAE”). O tratamento foi iniciado no dia da imunização (dia 0), dois dias após (dia 2) ou no 4º dia (dia 4). O sacrifício foi no 14º dia após a imunização. Foram utilizados 5 animais em cada grupo. As células foram obtidas do baço, linfonodo cervical (LC), linfonodo inguinal (LI) e linfonodo mesentérico (LM), e fenotipadas por citometria de fluxo. A significância da diferença entre os grupos foi calculada pelo teste t de Student (B, C, D) e por ANOVA com pós-teste Tukey (A). \* Representa p<0,05; \*\* p<0,1; \*\*\* p<0,01. A média do grupo *Naive* é representada como uma linha para referência, não interferindo na análise estatística.

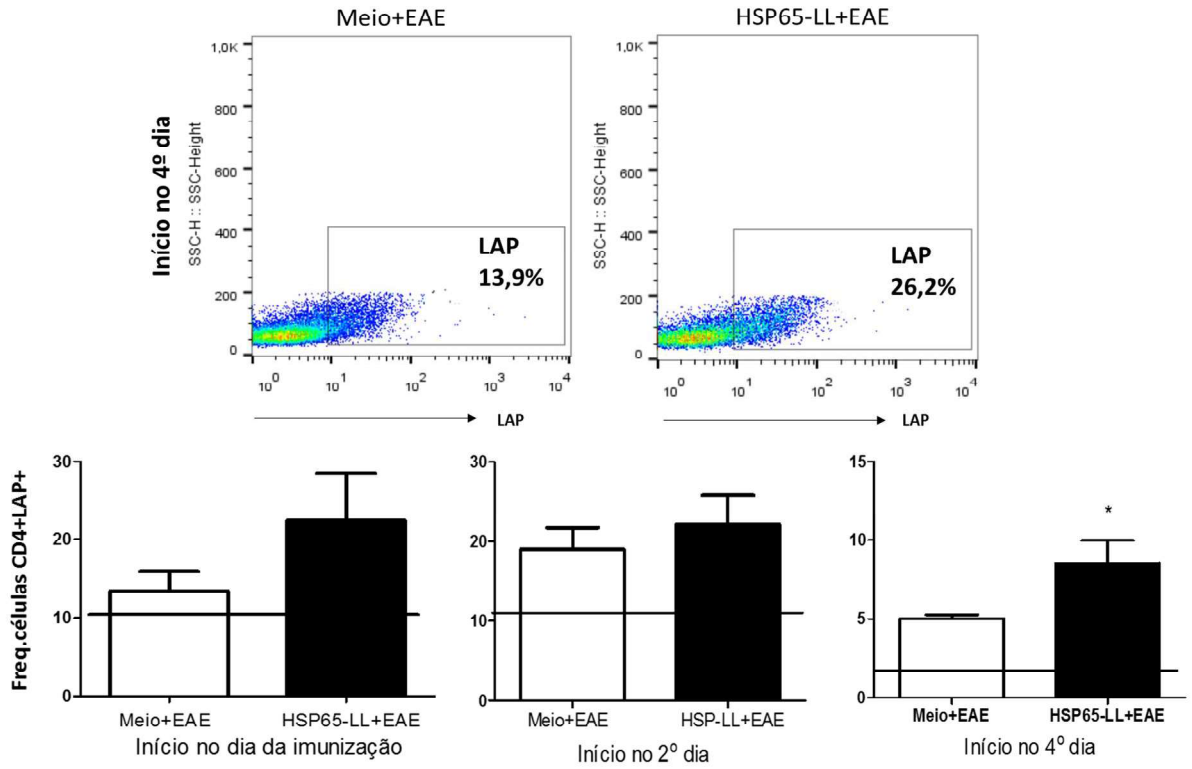
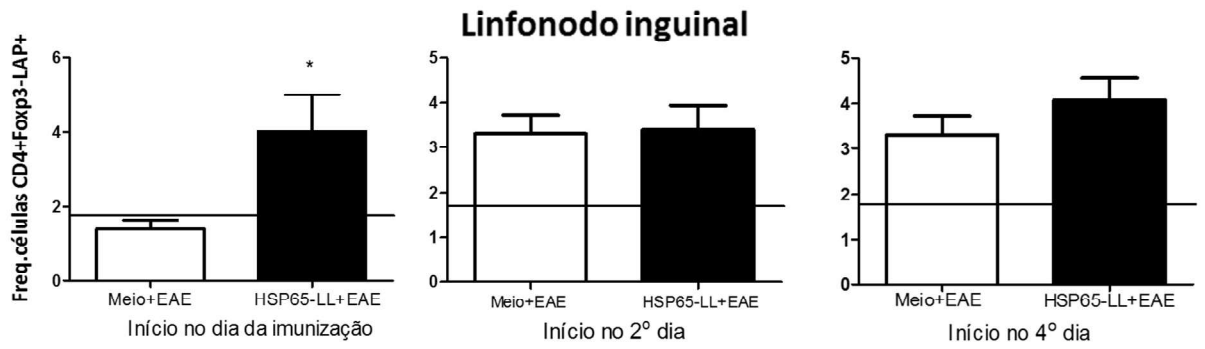
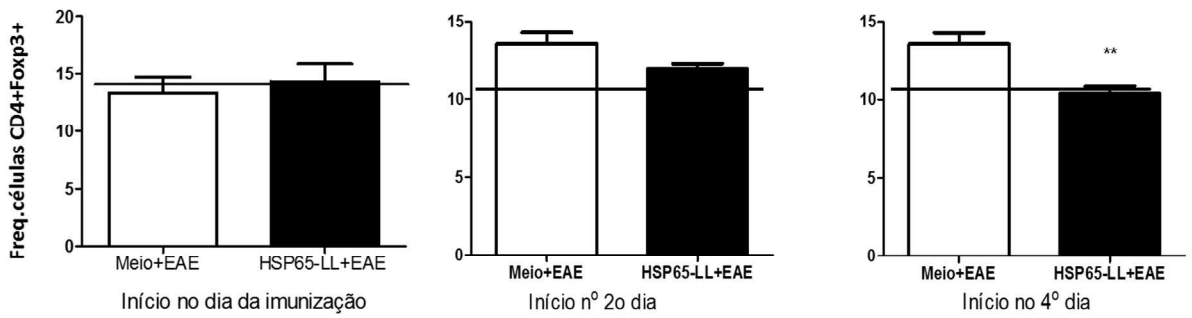
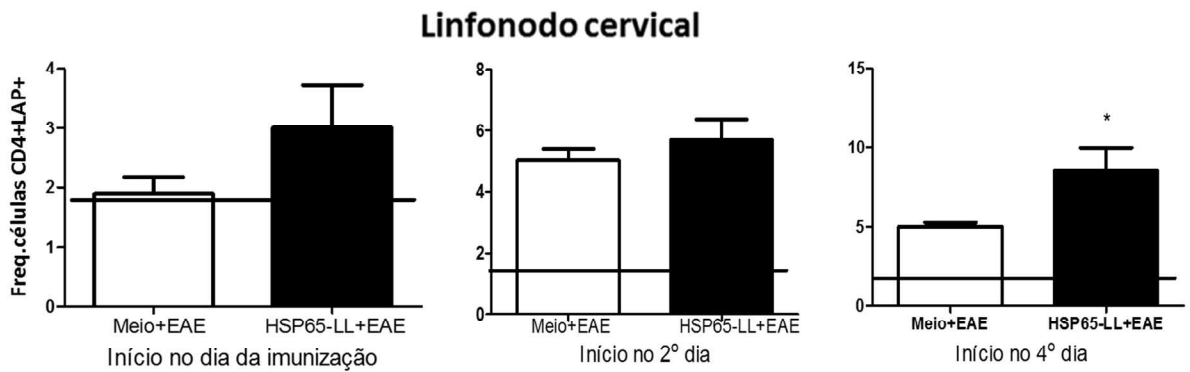
(A): Frequência das células CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD62<sup>-</sup> no baço. (B): Frequência das células CD4<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup>CD62<sup>+</sup> no baço. (C): Frequência das células CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD62<sup>-</sup> no linfonodo inguinal. (D): Frequência das células CD4<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup>CD62<sup>+</sup> no linfonodo inguinal.

## 6.4 O tratamento com *L.lactis* produtor de HSP65 alterou o perfil de células T CD4<sup>+</sup> com fenótipo regulador nos órgãos linfóides

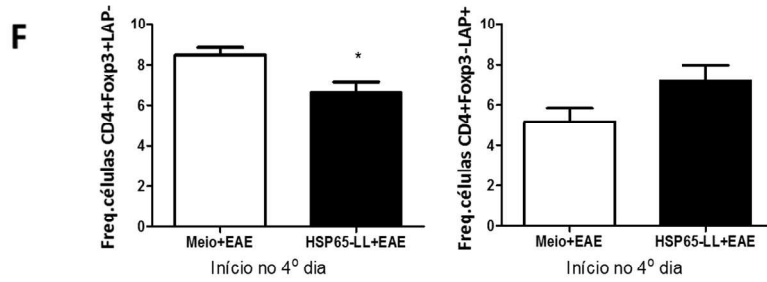
Em estudos anteriores, nosso grupo de pesquisa elucidou alguns mecanismos importantes na prevenção dos sinais clínicos da EAE pelo pré-tratamento dos animais com *Lactococcus lactis* produtor de HSP65, entre eles um aumento na frequência de células T reguladoras nos órgãos linfóides (principalmente as células Th3, as que expressam o LAP). Dessa forma, nosso próximo passo foi analisar se as células T reguladoras também estariam envolvidas no efeito protetivo do tratamento com *L.lactis* produtor de HSP65 em dias distintos após a imunização. Foram analisados quatro órgãos: baço, linfonodo cervical, linfonodo inguinal e linfonodo mesentérico. As células T reguladoras analisadas foram as que expressavam CD4 e foram distinguidas como expressando o fator de transcrição Foxp3 (Treg) e a molécula LAP (Th3). Obteve-se também a frequência daquelas expressando apenas uma dessas moléculas.

O tratamento iniciado no dia da indução da EAE foi importante para aumentar a frequência das células Th3 (nesse caso as CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>LAP<sup>+</sup>) no linfonodo inguinal. Já o iniciado no dia 2 não modificou em nada o perfil das células T reguladoras. A mudança mais significativa foi com a administração do *L.lactis* produtor do HSP65 a partir do dia 4, com aumento da frequência das células CD4<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> tanto no baço quando no linfonodo cervical. A frequência das células CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> aumentaram no baço e diminuíram no linfonodo cervical.



**B****C****Linfonodo cervical****D****E**

## Linfonodo mesentérico



**Figura 8: Fenótipo das células T reguladoras nos órgãos linfóides:** Camundongos C57BL/6 Foxp3/GFP foram imunizados para a indução de EAE. Os animais ingeriram por cinco dias apenas meio (grupo “Meio+EAE”) ou meio com *L.lactis* produtor de HSP65 (“HSP65-LL+EAE”). O tratamento foi iniciado no dia da imunização (dia 0), dois dias após (dia 2) ou no 4º dia (dia 4). O sacrifício foi realizado no 14º dia. Foram utilizados 5 animais em cada grupo. As células foram obtidas do baço (A, B), linfonodo cervical (C,D), linfonodo inguinal (E) e linfonodo mesentérico (F,G), e fenotipadas por citometria de fluxo. A significância da diferença entre os grupos foi calculada pelo teste t de Student. \* Representa  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,1$ ; \*\*\*  $p < 0,01$ . A média do grupo *Naive* é representada como uma linha para referência, não interferindo na análise estatística.

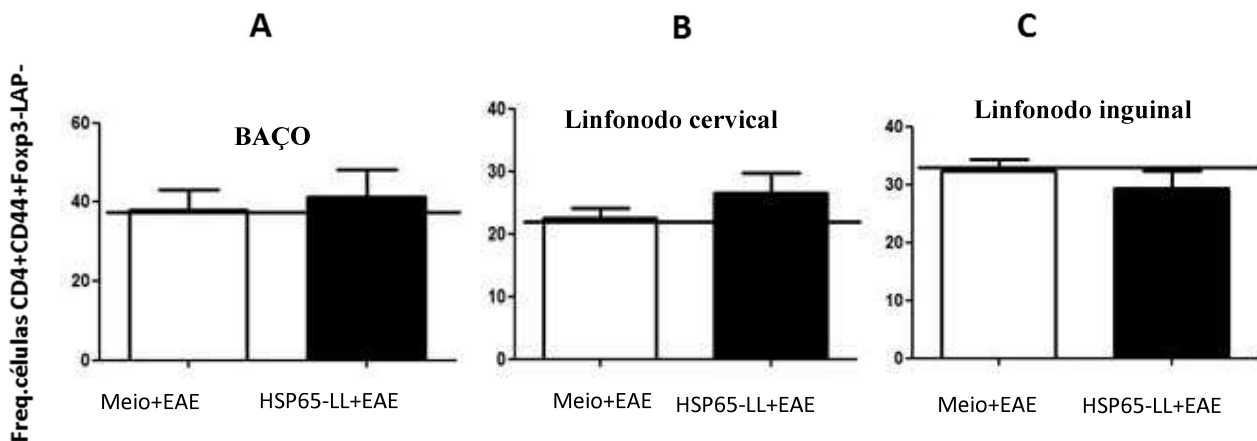
**(A):** Frequência das células T CD4+Foxp3+ no baço de animais com tratamentos iniciados nos dias 0, 2 e 4 após a imunização. Na parte de cima estão os plottings representativos da citometria de fluxo, demonstrando maior frequência no grupo tratado. **(B):** Frequência das células T CD4+LAP+ no baço de animais com tratamentos iniciados nos dias 0, 2 e 4 após a imunização. Na parte de cima estão os plottings representativos da citometria de fluxo, demonstrando maior frequência no grupo tratado. **(C):** Frequência das células T reguladoras CD4+Foxp3-LAP+ no linfonodo inguinal, em animais com tratamentos iniciados em dias distintos. **(D-E):** Frequência das células T reguladoras CD4+Foxp3+ e CD4+LAP+ no linfonodo cervical, em tratamentos iniciados em dias distintos **(F):** Frequência das células T reguladoras CD4+Foxp3+LAP- e CD4+Foxp3-LAP+ no linfonodo mesentérico, em tratamento iniciado no 4º dia após a imunização. **(G):** Frequência das células T reguladoras CD4+Foxp3+LAP- e CD4+Foxp3-LAP+

Surpreendentemente, no linfonodo mesentérico a frequência das células CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>LAP<sup>-</sup> estava reduzida no grupo dos animais tratados. Na Figura 8, estão representadas as frequências de células Treg e Th3 dentro da população CD4<sup>+</sup>.

### 6.5 O tratamento com *L.lactis* produtor de HSP65 não alterou a frequência das células CD4<sup>+</sup> potencialmente patogênicas

Após a constatação que o tratamento oral com o *L.lactis* produtor de HSP65 alterou a frequência de algumas sub-populações de células reguladoras, faltava averiguar exatamente qual o papel dele nas células potencialmente efetoras, especificamente aquelas com potencial patogênico. Decidimos analisar, como fenótipo desse tipo celular, os linfócitos CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>LAP<sup>-</sup>. Estas são células ativadas sem duas das moléculas importantes na

regulação, e com a expressão de um receptor importante para a chegada delas no tecido onde ocorrem as lesões. Interessantemente, o tratamento iniciado no dia da imunização (ponto em que se testou a frequência dessas células), embora tenha melhorado o índice clínico, não alterou a proporção desses linfócitos possivelmente patogênicos. As porcentagens referem-se à frequência das células sempre dentro do grupo dos linfócitos T CD4+.



**Figura 9: O *L.lactis* produtor de HSP65 não influencia na frequência das células CD4+ possivelmente patogênicas.** Camundongos C57BL/6 Foxp3/GFP foram imunizados para a indução de EAE. Os animais ingeriram por cinco dias apenas meio (grupo “Meio+EAE”) ou meio com *L.lactis* produtor de HSP65 (“HSP65-LL+EAE”). O tratamento foi iniciado no dia da imunização, dois dias após ou no 4º dia. Foram utilizados 5 animais em cada grupo. As células foram obtidas do baço, linfonodo cervical, linfonodo inguinal e linfonodo mesentérico, e fenotipadas por citometria de fluxo. A significância da diferença entre os grupos foi calculada pelo teste t de Student (B, C, D) e por ANOVA com pós-teste Tukey (A). \* Representa  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,1$ ; \*\*\*  $p < 0,01$ . A média do grupo *Naive* é representada como uma linha para referência, não interferindo na análise estatística.

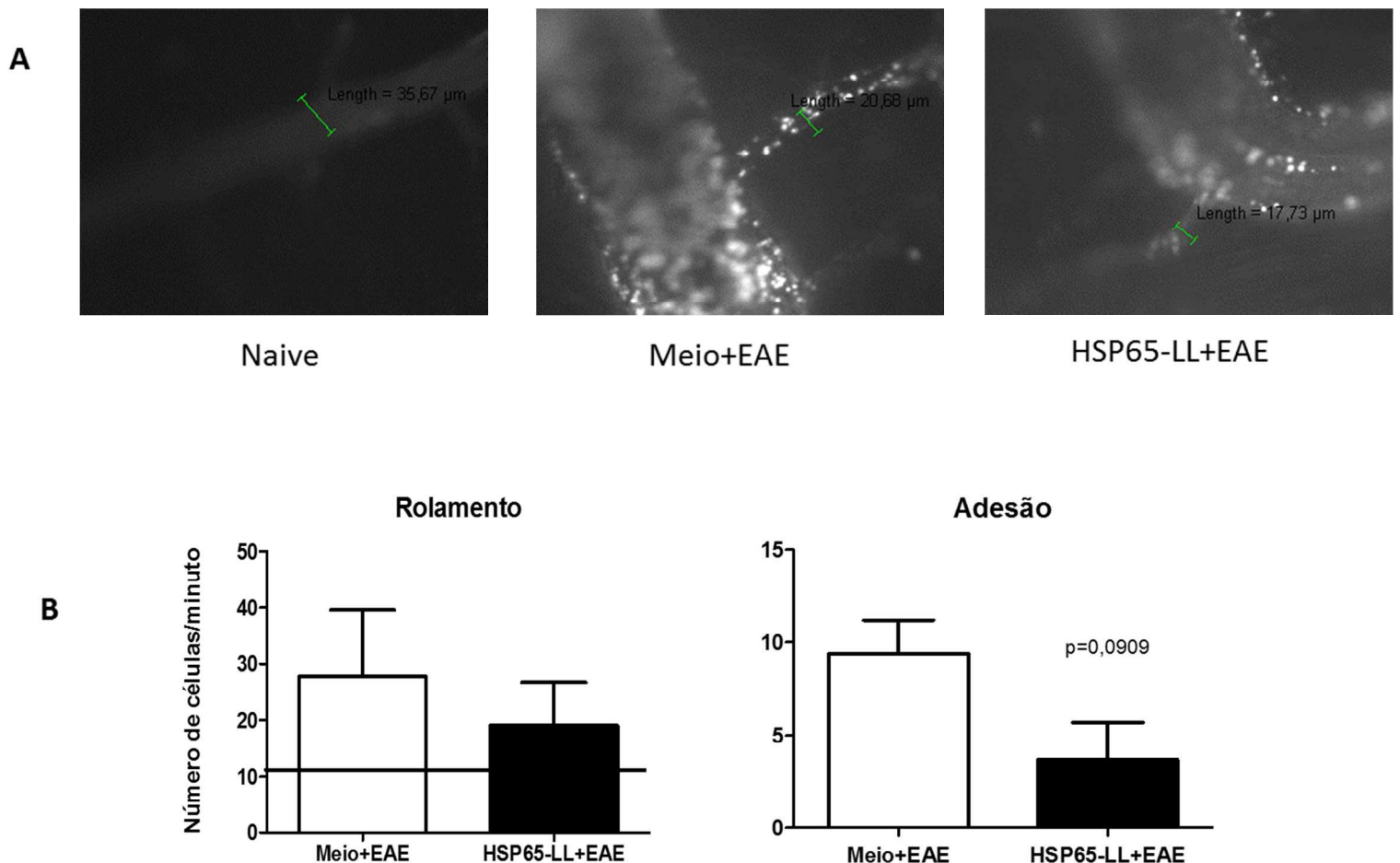
(A): Frequência das células possivelmente patogênicas (CD4+CD44+Foxp3-LAP-) no baço, tratamento iniciado no dia da imunização (dia 0). (B): Frequência das células possivelmente patogênicas (CD4+CD44+Foxp3-LAP-) no linfonodo cervical, tratamento iniciado no dia 0. (C): Frequência das células possivelmente patogênicas (CD4+CD44+Foxp3-LAP-) no linfonodo inguinal, tratamento iniciado no dia 0.

## 6.6. A prevenção da EAE se associou com a redução da migração de leucócitos para a medula espinhal

Nos camundongos C57BL/6 cujo tratamento iniciou-se no 4º dia após a indução da EAE, foi avaliado se o tratamento com *L.lactis* HSP65 induzia uma redução no recrutamento de leucócitos para a medula espinhal. Em estudo prévio, mostramos que o pré-tratamento com a bactéria recombinante resultava em prevenção da doença e na redução da migração de leucócitos para a medula espinhal (GUIMARÃES, 2013). No entanto, o efeito do *L.lactis*

HSP65 no protocolo testado no presente estudo ocorria após a indução da doença. O mecanismo de inibição da doença poderia, assim, ser distinto. Embora não se tenha conseguido observar estatisticamente o fenômeno (provavelmente pelo alto erro padrão devido a alguns vídeos não terem sido usados no teste pela perda da qualidade), observamos uma tendência para redução do rolamento e da adesão dos leucócitos avaliados pela microscopia intravital sugerindo que também no tratamento, o *L.lactis* HSP65 pode afetar a migração de leucócitos pelos vasos que irrigam a medula espinhal. Outros experimentos serão necessários para confirmar esse resultado.

Durante a realização da microscopia intravital em um animal do grupo controle (Meio+EAE) foi observada uma massa branca nos músculos e tecido conjuntivo próximos à coluna vertebral, bem como muita angiogênese e aumento da vasodilatação na medula espinhal. Em outro animal desse mesmo grupo, foi observada atrofia dos músculos dorsais (próximos à coluna vertebral) e também aumento da angiogênese, inclusive nos ossos das vértebras. Tais observações, embora não quantificadas, qualitativamente servem para demonstrar aspectos em que a arquitetura e estrutura do sistema nervoso central são alteradas.



**Figura 10. A prevenção da EAE ocorre pela redução da migração de leucócitos para a medula espinhal:** Camundongos C57BL/6 foram imunizados para a indução de EAE. Os animais ingeriram por cinco dias apenas meio (grupo “Meio+EAE”) ou meio com *L.lactis* produtor de HSP65 (“HSP65-LL+EAE”). O tratamento foi iniciado no 4º dia após a imunização. Foram utilizados 4 animais no grupo “Naive”, 5 no grupo “Meio+EAE” e 3 animais no grupo “HSP65-LL+EAE”. No 14º dia após a imunização, os animais foram devidamente anestesiados e mantidos vivos em uma placa de vidro, em um ambiente aquecido a 37°C. Leucócitos foram marcados por administração venosa de rodamina. Vênulas pós-capilares com diâmetro entre 20 e 40µm foram analisadas. Na figura **A** podem ser visualizadas imagens representativas de cada grupo. **(B)**: Células foram consideradas rolando ou aderentes conforme descrito na metodologia. As barras correspondem às médias dos dados obtidos por grupo + erro padrão. A significância das diferenças entre os grupos foram calculadas pelo test t de Student. A média do grupo Naive é representada como uma linha para referência, não interferindo na análise estatística.

Durante a realização da microscopia intravital, em um animal do grupo controle (Meio+EAE) foi observada uma massa branca nos músculos e tecido conjuntivo próximos à coluna vertebral, bem como muita angiogênese e aumento da vasodilatação na medula espinhal. Em outro animal desse mesmo grupo foi observada atrofia dos músculos dorsais (próximos à coluna vertebral) e também aumento da angiogênese, inclusive nos ossos das vértebras. Tais observações, embora não quantificadas, qualitativamente servem para demonstrar aspectos em que a arquitetura e estrutura do sistema nervoso central são alteradas.

## 7. DISCUSSÃO

Esta tese de doutorado está inserida em um amplo contexto de estudos em imunorregulação do Laboratório de Imunobiologia da UFMG. O grupo de pesquisa em Imunobiologia, iniciado pelo professor Nelson Monteiro Vaz no ano de 1984, se notabilizou por trabalhos inovadores na área de tolerância oral em uma época em que poucos pesquisadores tratavam desse assunto. Inicialmente os aspectos mais básicos eram avaliados, como a construção da identidade imunológica do indivíduo, os fatores que determinam a ativação do sistema imune e as mudanças envolvidas com o envelhecimento e suplementação vitamínica, dentre outros (VAZ; FARIA, 1980; RIOS *et al*, 1988; VAZ *et al*, 1997; MENEZES *et al*, 2003; MEDEIROS *et al*, 2015). Entender o mecanismo do sistema imune em homeostasia nunca deixou de ser o objetivo do laboratório. Entretanto, com o passar do tempo, aspectos clínicos também foram incorporados aos estudos em tolerância oral. Foi descrito que a indução da tolerância oral em camundongos é prejudicada quando se tem uma gastrite induzida por álcool, por exemplo (ANDRADE; VAZ; FARIA, 2003), ou que ela pode ser efetiva em casos em que um determinado antígeno é administrado pela via oral anteriormente à imunização por esse mesmo antígeno ou ainda se a indução da tolerância oral for iniciada em um tempo curto após a imunização (CONDE *et al*, 1998).

Com os resultados descritos por vários grupos mostrando que a administração oral de antígenos solúveis era capaz de prevenir o desenvolvimento de doenças inflamatórias experimentais (FARIA *et al*, 2006b), tornou-se um objetivo aprimorar o uso da tolerância oral em diversos modelos animais, com metodologias mais eficazes, com menor custo e em tempos mais tardios do desenvolvimento das doenças. Nesse contexto, a utilização de probióticos foi importante para otimizar os efeitos da tolerância oral. A bactéria gram-positiva *Lactococcus lactis* têm sido muito utilizada pelo grupo do Laboratório de Imunobiologia e seus colaboradores nos últimos anos. A espécie *Lactococcus lactis* da cepa NCDO2118 foi descrita como capaz de reduzir os sintomas da colite experimental induzida por sulfato de sódio dextrana (DSS) em camundongos quando administrada oralmente por 4 dias, entre dois ciclos de indução de colite por DSS. Esse efeito foi acompanhado da redução de citocinas inflamatórias locais como a IL-6 e pela manutenção dos níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 em níveis comparáveis aos dos animais não manipulados mesmo durante o desenvolvimento da doença (LUERCE *et al*, 2014).

O trabalho de inserção de plasmídeos codificadores de certas proteínas à bactéria *Lactococcus lactis* pelo grupo dos Profs. Anderson Miyoshi e Vasco Azevedo do Departamento de Biologia Geral do ICB-UFMG permitiu o uso da bactéria como um adjuvante e um dispositivo de liberação lenta de antígenos relevantes para a indução de tolerância oral, sem aumentar, contudo, o grau de complexidade da metodologia e nem os custos envolvidos. A cepa portando um plasmídeo codificador da proteína HSP65 tem sido a mais usada no Laboratório de Imunobiologia nos estudos de tolerância oral em modelos de doenças inflamatórias crônicas. Ao contrário de um plasmídeo que expressa alguma proteína com função imunológica já conhecida e mais previsível, a expressão da HSP65 torna a resposta imune mais complexa e variável, dependendo do modelo a ser estudado, o ambiente em que ela está inserida e diversas outras variáveis.

Como já mencionado, as proteínas de choque térmico são consideradas antígenos dominantes, ou seja, existem circuitos de linfócitos T e B no corpo reativos a essas proteínas que são parte importante da rede de linfócitos reguladores da atividade imunológica engajada na homeostase do sistema imune. Dentre essas células reguladoras, as mais importantes são aquelas naturais auto-reativas formadas no timo (COHEN, 2007). Tais propriedades imunológicas das proteínas de choque térmico as tornaram objetos de estudos em vários modelos de doenças, principalmente as autoimunes (COELHO, FARIA, 2012). A idéia de se utilizar a HSP65 como antígeno para a indução de tolerância oral seria aproveitar exatamente dessa propriedade das HSPs de funcionar como antígenos capazes de recrutar células T reguladoras naturais e além disto, células T (e talvez B) reguladoras induzidas pela administração oral. Outra razão importante seria a sua expressão aumentada durante o curso da inflamação, tornando as HSPs então antígenos ubíquos e muito expressos em todas as doenças inflamatórias crônicas. Essa característica resolveria o grande problema de escolha de antígenos alvo para a indução de tolerância em grande parte das doenças inflamatórias crônicas cujos antígenos alvos não são conhecidos (doença de Crohn, aterosclerose, obesidade, etc). A capacidade de imuno-modulação de doença inflamatória crônica pela indução de tolerância oral à proteína HSP65 purificada já foi descrita em um modelo de aterosclerose em que camundongos com deficiência para o receptor de LDL (*low density lipoprotein*) e submetidos a uma dieta hipercolesterolêmica eram tratados HSP65 de *Mycobacterium tuberculosis* purificada antes da introdução da dieta. Esses animais apresentaram redução nas placas ateroscleróticas quando previamente tratados com HSP65 por via oral e pela via nasal (MARON et al, 2002; HARATS et al, 2002). No entanto, o tratamento oral com HSP65

purificada apresenta dois problemas: a) a contaminação potencial da proteína com toxinas bacterianas (lipopolissacáride); b) o alto custo de produção dessa proteína em quantidades suficientes para o tratamento oral mesmo de camundongos. Assim, o uso *L.lactis* produtor de HSP65 teve como objetivo resolver esses dois problemas já que o *Lactococcus* é uma bactéria Gram-positiva e não tem endotoxinas. A presença do plasmídeo produtor de HSP65 permite a produção e secreção de quantidades terapêuticas da proteína. Além disto, alguns estudos utilizando essa bactéria pelo nosso grupo (MERCADANTE et al, 2014; LUERCE et al, 2014) mostrou que ela própria apresenta propriedades anti-inflamatórias que poderiam, assim, auxiliar no propósito de induzir tolerância oral. Assim, a bactéria recombinante reúne dois elementos importantes: ser um vetor com propriedades probióticas produzindo uma proteína com capacidade imunorreguladora.

Em estudos prévios do nosso grupo, foi mostrado que a tolerância oral pela ingestão contínua do *L.lactis* produtor de HSP65 preveniu completamente a colite induzida por DSS em camundongos C57BL/6. O fenômeno foi associado com a redução da produção de citocinas inflamatórias no cólon, como IFN- $\gamma$ , IL-6, e TNF- $\alpha$ , bem como com a maior expressão de IL-10 nesse órgão e o aumento do número de células T reguladoras CD4+Foxp3+ e CD4+LAP+ no baço e linfonodos mesentéricos (GOMES-SANTOS *et al*, 2017). De modo semelhante, resultados positivos foram obtidos pela indução de tolerância oral utilizando a *L.lactis* produtora de HSP65 em modelos murinos de artrite reumatóide. Também nesse modelo, a redução dos sinais clínicos e histológicos da artrite induzida por colágeno foi dependente de IL-10 e se associou a um aumento na frequência de células T CD4+LAP+ (SILVA, 2017).

No modelo de encefalomielite autoimune experimental (EAE) em camundongos C57BL-6 imunizados com peptídeo da MOG, a tolerância oral pela ingestão contínua de meio de cultura contendo a bactéria *L.lactis* produtora de HSP65 também foi muito eficiente. Os primeiros experimentos utilizando essa bactéria recombinante no modelo de EAE foram realizados por Rafael Machado Rezende com a minha colaboração. Foi constatado que, nesse modelo, o pico dos sinais clínicos era geralmente no 14º dia após a indução da doença. O tratamento com *L.lactis* produtora de HSP65 dez dias antes da indução da EAE reduziu as manifestações clínicas da doença (score clínico) quando comparadas ao grupo que recebia apenas meio e ao grupo que recebia a cepa de *L.lactis* controle (com plasmídeo não codificante) (REZENDE *et al*, 2013).

O mecanismo de prevenção da EAE pelo *Lactococcus lactis* produtor de HSP65 trouxe algumas semelhanças, mas também diferenças em comparação com os modelos citados, mostrando a complexidade da resposta imune estimulada pelas proteínas de choque térmico. A citocina IL-10 estava aumentada em culturas celulares de linfonodos mesentéricos obtidos de camundongos C57BL/6 no 14º dia após a imunização, enquanto que as citocinas pró-inflamatórias IL-17 e IFN- $\gamma$  estavam reduzidas em culturas de baço nesse mesmo ponto. Demonstramos ainda que a principal citocina envolvida no processo de prevenção da EAE era TGF- $\beta$ . As células T reguladoras com o fenótipo CD4+LAP+ (classicamente descritas como Th3, cuja forma latente do TGF- $\beta$  é encontrada na membrana como um *latente associated peptide*) tiveram sua frequência aumentada tanto nos linfonodos inguinais e mesentéricos como no baço nos dias 2 e 4 após a imunização, enquanto que as células T reguladoras clássicas CD4+CD25+Foxp3+ (Treg) só aumentaram no linfonodo inguinal. A frequência das células expressando TGF- $\beta$  (de membrana e intracelular) também aumentou e a depleção das células expressando LAP alguns dias antes da imunização aboliu completamente o efeito do tratamento sugerindo, então, que a tolerância oral à HSP65 nesse modelo dependia de células LAP+ (REZENDE et al, 2013).

Com esses resultados relativos a possíveis mecanismos explicativos para a prevenção da EAE pelo *L.lactis* produtor de HSP65, **as duas principais perguntas do presente trabalho foram: 1) se o *L.lactis* HSP65 teria um efeito inibitório durante o curso da EAE já induzida comparável àquele obtido pela administração prévia da bactéria recombinante; 2) em caso positivo, qual seria o mecanismo de ação desse tratamento.**

Esse objetivo consistiu em um desafio maior, visto que os fatores desencadeadores da doença (como a ativação dos leucócitos que irão migrar para a área afetada) já começam a ocorrer antes dos sinais clínicos serem visíveis. No dia 7 após a imunização, já foi descrito o aparecimento de infiltrado inflamatório no cérebro e na medula espinhal de camundongos imunizados com peptídeo da MOG adsorvido em CFA (DIAS *et al*, 2015). Adiciona-se a isso o fato de que ocorre, nos órgãos linfóides secundários, uma mudança na frequência de células expressando determinados receptores de quimiocinas importantes para a migração celular já no 4º dia após a imunização (GUIMARÃES, 2013).

A primeira tentativa foi realizada com o início do tratamento oral com o *L.lactis* produtor de HSP65 no dia da imunização e tentativas posteriores nos dias 2, 4 e 5 pós imunização. No primeiro experimento, foi também utilizada a bactéria contendo o plasmídeo

vazio (não codificador da HSP65) como controle. Foram observadas diferenças no índice clínico apenas nos animais que receberam o *L.lactis* produtor de HSP65. Os resultados apresentados pelos grupos que receberam a cepa controle ou apenas meio M17 foram iguais. Na figura 4, é possível perceber que nesse mesmo ponto de início do tratamento, temos uma diferença estatisticamente significativa do grupo HSP65-LL+EAE com os demais a partir do 11º dia.

Estudos anteriores utilizando o tratamento prévio com as bactérias recombinantes mostraram também que a administração da bactéria *L.lactis* com o plasmídeo vazio não teve efeito modulador sobre a EAE, exatamente como o grupo tratado apenas com meio. Assim, os testes seguintes foram realizados utilizando-se apenas o grupo tratado com meio como controle.

Foram testados com sucesso dois novos pontos de início do tratamento: os dias 2 e 4 após a imunização. Curiosamente, o tratamento iniciado no 4º dia reduziu a manifestação da doença um pouco antes do iniciado no 2º dia. As tentativas de indução de tolerância oral em dias posteriores foram frustradas, provavelmente porque, logo após a indução da doença, o sistema imune já inicia uma resposta nos órgãos linfoides e, como citado anteriormente, no dia 7 após a imunização, já se observa inflamação no sistema nervoso central, embora em um grau menor do que em momentos posteriores (DIAS *et al*, 2015). As células imunes inatas também contribuem para o início da doença acontecer de forma tão rápida. Células da linhagem mielóide como macrófagos e células dendríticas, além de serem apresentadoras de antígeno para os linfócitos CD4+ infiltrantes, também se acumulam no sistema nervoso central, sendo que monócitos com o fenótipo CD11b+CD62L+Ly-6Chi têm frequência aumentada na corrente sanguínea mesmo antes dos sinais clínicos da EAE (KING *et al*, 2009).

Através das análises histológicas, foi possível observar que a redução dos sinais clínicos da doença em decorrência do tratamento com o *L.lactis* produtor de HSP65 é de fato proporcional à redução da inflamação na medula espinhal e no cérebro dos animais. De forma semelhante ao que observamos em estudos anteriores utilizando o pré-tratamento com a bactéria recombinante, a redução da inflamação foi associada à redução do infiltrado inflamatório, além da redução dos focos de lesão. Kuerten e colaboradores (2007) demonstraram a correlação entre infiltrado inflamatório no sistema nervoso central e o desenvolvimento da EAE induzida por MOG<sub>35-55</sub>. Por outro lado, já foi demonstrado que ocorre uma vacuolização na medula espinhal no pico das manifestações clínicas da doença (DOS SANTOS *et al*, 2008; KIHARA *et al*, 2005), algo também observado nesse trabalho nos animais com sinais clínicos mais evidentes.

Esse fenômeno pode ter diversas causas, como apoptose, necrose ou perda da arquitetura normal do parênquima do órgão.

Como foi obtido um efeito modulador significativo nos dias 0, 2 e 4 pós-imunização, tanto no escore clínico (Figura 1) quanto no escore histológico (Figura 2), a pergunta seguinte foi se o tratamento mobilizaria os mesmos mecanismos desencadeados pelo pré-tratamento.

Nos resultados anteriores no modelo de EAE, foi demonstrado que a tolerância oral induzida pelo *L.lactis* produtor de HSP65 antes da doença não agia reduzindo a frequência das células ativadas. Ao contrário, o que ocorria era uma manutenção ou aumento das células com marcadores de ativação recente (CD4+CD69+) e tardia (CD4+CD44+) nos linfonodos inguinais, mesentéricos e baço, nos pontos iniciais após a indução da doença (dias 1, 2 e 4). Nesse trabalho anterior, a administração do *L.lactis* HSP65 ocorreu dez dias antes da indução da doença e nossos resultados mostraram claramente que células T CD4+ reguladoras (Foxp3+ e LAP+) aumentavam nos linfonodos inguinais e no baço dois dias após a imunização precedendo as células T CD4+ efetoras. Assim, a administração prévia de HSP65 parece induzir células T reguladoras que previnem o desenvolvimento da doença pela inibição das células T potencialmente patogênicas de forma ativa (REZENDE, 2013). No protocolo testado no presente estudo, a administração oral de *L.lactis* HSP65 ocorreu concomitantemente ou depois da indução de células T CD4+ inflamatórias pela imunização com MOG em adjuvante.

Para esclarecer essa questão, foram analisadas as frequências de células T CD4+CD44-CD62L+, células virgens (*naive*) que não recirculam e ficam retidas nos órgãos linfoides, e as células CD4+CD44+CD62-, consideradas células efetoras e recirculantes, que chegam aos tecidos (HU *et al*, 2008). O momento escolhido para análise foi o 14º dia após a imunização por ser o pico da doença e porque um ponto anterior iria se sobrepor ou se aproximar muito do período de tratamento. Além disso, mesmo no ponto em que os sinais clínicos estão no pico, ainda há uma intensa atividade nos órgãos linfoides e não apenas no sistema nervoso central, o que pode ser comprovado pelas diferenças que observamos anteriormente quanto à expressão de integrinas em linfócitos T (GUIMARAES, 2013) e pelos dados obtidos neste trabalho.

Quanto ao perfil de ativação celular nos órgãos linfoides secundários, diferenças estatisticamente significativas entre o grupo tratado e o controle foram obtidas no baço e no linfonodo inguinal, mas apenas nos tratamentos iniciados nos dias 2 e 4 após a indução da doença. No baço, o tratamento com o *L.lactis* produtor de HSP65 a partir do 4º dia após a imunização foi importante para manter a frequência dos linfócitos possivelmente ativados

(CD4+CD44+CD62-). No linfonodo inguinal, com o tratamento iniciando no 2º dia após a imunização, a frequência dessas células reduziu. É importante ressaltar que células ativadas (efetoras) não necessariamente são células com potencial patogênico. Células T reguladoras também necessitam de moléculas de ativação para conseguir exercer sua ação anti-inflamatória. Além disso, já foi demonstrado *in vitro* que o CD44 estimula a expressão do fator de transcrição Foxp3, em parte pelo aumento da liberação de IL-2, e ainda aumenta a liberação de IL-10 e a presença do TGF- $\beta$  (o LAP) (BOLLYKY *et al*, 2009).

A participação de dois subtipos de células T reguladoras foram analisadas: CD4+Foxp3+ (Treg) e CD4+LAP+ (Th3). Essa escolha se deveu ao fato de que, em estudo anterior utilizando *L.lactis* HSP65 no mesmo modelo de EAE, essas células se mostraram essenciais para a indução da tolerância oral a HSP65 e para a prevenção da EAE (REZENDE *et al*, 2013). Dentro dessas duas sub-populações de células Treg, foram ainda analisadas as células que expressavam apenas Foxp3 (CD4+Foxp3+LAP-), apenas LAP (CD4+Foxp3-LAP+) e aquelas que expressavam ambas as moléculas (CD4+Foxp3+LAP+). As células T CD4+Foxp3+ foram descritas há mais de uma década como sendo células importantes na manutenção da tolerância imunológica aos autocomponentes (BENETT *et al*, 2001; HORI *et al*, 2003; SAKAGUCHI, 2005). Já as células CD4+LAP+ foram descritas mais recentemente como importantes na homeostase imunológica e no imuno-regulação em modelos de colite (NAKAMURA; KITANI; STROBER, 2001; OIDA *et al*, 2003). Embora as características principais dessas células sejam provenientes dessas moléculas, outros fatores também influem, como os abordados por Elkord e colaboradores (2015). Células T reguladoras expressando LAP e GARP (*glycoprotein A repetitions predominant*) foram encontradas dentro do subgrupo CD4+Helios+, independente da expressão do Foxp3, e essas células têm o potencial de expressar IL10, além do TGF- $\beta$  já presente na membrana. O fator de transcrição Helios (e não Foxp3) foi descrito, então, como o marcador de ativação das células CD4+LAP+GARP+. Esse fator de transcrição foi proposto inicialmente como distintivo das células T CD4+CD25+ reguladoras clássicas (Foxp3+) tímicas ou naturais, sendo que nessas células ele teria a propriedade de aumentar as suas características supressivas (THORNTON *et al*, 2010).

O aumento da frequência das células T ativadas CD4+CD44+CD62L- no baço (em relação ao grupo controle) com o tratamento iniciado no 4º dia após a imunização coincidiu com o aumento das células T reguladoras nesse mesmo órgão, sob as mesmas condições de tratamento. Isso permite fazer uma correlação entre as duas, visto que células T reguladoras necessitam de moléculas de ativação para exercer sua ação efetora. O aumento foi verificado

quando as células eram discriminadas quanto à expressão de LAP ou de Foxp3. Entretanto, quando essas duas moléculas eram analisadas ao mesmo tempo, nenhum subtipo de célula T reguladora aumentou. Portanto, houve maior frequência de células com o fenótipo CD4+Foxp3+ e CD4+LAP+, mas não se analisados os fenótipos CD4+Foxp3+LAP-, CD4+Foxp3-LAP+, CD4+Foxp3+LAP+. A importância desse resultado no baço é porque trata-se de um órgão onde circulam todas as células presentes no sangue representando, de forma global, o estado imunológico do organismo.

No linfonodo inguinal, observou-se aumento das células CD4+Foxp3-LAP+, no caso em que o tratamento foi iniciado no dia da indução da doença. Existem poucos relatos sobre o papel dessas células na literatura. Em um modelo de alergia respiratória induzida por inalação de OVA, células CD4+Foxp3-LAP+ presentes nos pulmões e respectivos linfonodos drenantes mostraram-se importantes para a indução de tolerância oral funcionar (DUAN *et al*, 2011). Em nossos trabalhos anteriores estudando a prevenção da EAE pelo *L.lactis* produtor de HSP65, observamos que esta era a população de células Treg mais significativamente aumentada mediante o tratamento com a bactéria recombinante (REZENDE *et al*, 2013) e que as principais mudanças nas frequências e expressão de receptores de quimiocinas e das integrinas ocorreram principalmente nessa população de Treg (GUIMARÃES, 2013). Já no modelo de tratamento testado neste estudo, mesmo com a relativa distância entre o início da administração oral do *L.lactis* produtor de HSP65 (no mesmo dia da imunização) com o dia do sacrifício (14º dia após a imunização), foram observadas alterações significativas na frequência de linfócitos T CD4+ reguladores no linfonodo inguinal.

Os linfonodos cervicais exercem um papel importante na indução da EAE. Eles funcionam como locais de recrutamento e ativação de células encefalitogênicas que migrarão então para o sistema nervoso central (PHILLIPS *et al*, 2011). De certa maneira, refletem o perfil inflamatório da medula espinhal e cérebro. Neste trabalho, foram observado um aumento na frequências de células T CD4+ LAP+ (expressando ou não Foxp3) reguladoras nesses linfonodos apenas com o tratamento pelo *L.lactis* produtor de HSP65 iniciado no 4º dia após a imunização. As células T CD4+Foxp3+, por outro lado, tiveram frequência igual à do grupo *naive* e menor que do grupo controle, sugerindo que, nesse momento do tratamento e nesse órgão, sua importância é menor do que das células CD4+LAP+ na inibição da EAE.

Os linfonodos mesentéricos são de grande importância para a indução da tolerância oral, visto que são os primeiros em que os efeitos da HSP65, provavelmente em células

apresentadoras de antígenos, ocorrem (PABST; MOWAT, 2012). Neles foi observado que, quando o tratamento foi iniciado no 4º dia após a imunização, as células T reguladoras com o fenótipo CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>LAP<sup>-</sup> têm a frequência reduzida, o que novamente sugere que possivelmente não é esse o principal tipo celular envolvido na regulação induzida pelo tratamento. Por sua vez, as células CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>LAP<sup>+</sup> não têm sua frequência alterada. O momento de análise da frequência dessas células, no entanto, é muito tardio, 14º dia após a imunização, e é também o pico da doença. Possivelmente as células T reguladoras que tenham exercido seu efeito imuno-modulador sobre a inflamação já migraram dos linfonodos mesentéricos onde provavelmente foram induzidas em fases mais precoces.

Em uma análise geral dos resultados sobre a ativação celular e células T reguladoras, observamos que, no baço, mesmo observado já no auge dos sinais clínicos, a manutenção da frequência de células ativadas e a maior frequência das reguladoras no grupo tratado com *L.lactis* HSP65 resultou, nesse órgão, em um perfil predominantemente regulador de células T CD4<sup>+</sup>. Como o baço representa em grande parte o perfil imunológico sistêmico do indivíduo, esse quadro parece traduzir o efeito da tolerância. Nos linfonodos inguinais, mesentéricos e cervicais, foi observado aumento de células CD4<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> (independente da expressão do Foxp3) ou de células CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>LAP<sup>+</sup>, mas nunca de células CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> ou de células CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>LAP<sup>-</sup> (essa última, inclusive, chegou a se reduzir). As células Foxp3<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup>, que se encontram aumentadas na presença de suplementação com vitamina e efetivas na regulação da colite experimental (MEDEIROS *et al*, 2015), foram encontradas em frequência muito discreta em todos os momentos examinados, não apresentando nenhum sinal de envolvimento com os resultados.

Após a confirmação de que o modelo de tratamento oral por *L.lactis* produtor de HSP65 não alterava significativamente a frequência de células T CD4<sup>+</sup> ativadas, mas se associava a um aumento na frequência das células T reguladoras (principalmente as células T CD4<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup>), restava ainda averiguar se a modulação da EAE envolvia a redução na proporção das células possivelmente patogênicas. O fenótipo escolhido como o representante dessas células, portanto, tinha de ser bem específico, apresentando moléculas típicas de células ativadas, estando ausentes as principais moléculas relacionadas as células T reguladoras. Além de ser o receptor do ácido hialurônico e contribuir para a migração dos leucócitos na matriz extracelular, o CD44 contribui para a expressão do Foxp3 nas células T reguladoras, de forma que duas classes dessas células já foram descritas com base no CD44: CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup>, tendo a primeira maior potencial supressivo e sendo capaz de maior produção

de IL-10 (LIU *et al.*, 2009). Todavia, como as células T efetoras não reguladoras também necessitam do CD44 para conseguir migrar até os sítios de inflamação, o fenótipo escolhido para distinguir células T com possível potencial patogênico foi CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>Foxp3-LAP<sup>-</sup>.

Iniciando o tratamento com o *Lactococcus lactis* produtor de HSP65 no dia da imunização, observamos que esse grupo não apresentou diferenças em relação aos outros quanto a frequência das células possivelmente patogênicas, no 14º dia após a indução da EAE. Esse resultado é consistente com os demais já obtidos no estudo em que o *L.lactis* HSP65 foi administrado antes da indução da EAE e foi capaz de prevenir a doença (REZENDE, 2013). Nesse estudo anterior, as células T expressando moléculas relativas à ativação recente e tardia (CD69 e CD44) não se encontravam reduzidas nos animais tratados. Além disso, esses animais apresentavam imunidade preservada para antígenos de agentes infecciosos indicando claramente que o pré-tratamento com *L.lactis* produtor de HSP65 induzia um estado de tolerância seletiva e não uma imunossupressão nos animais. Camundongos tratados com *L.lactis* produtor de HSP65 e infectados com a bactéria *Salmonella typhimurium* 10 dias após o final do tratamento apresentaram sobrevivência e títulos de anticorpos anti-*Salmonella* no soro comparáveis àqueles encontrados em animais *naive*. Com os resultados obtidos nesse trabalho e os demais obtidos anteriormente, podemos afirmar que o pré-tratamento ou o tratamento com *L.lactis* HSP65 durante o curso da EAE não interfere na capacidade de responder a antígenos externos.

O próximo passo foi averiguar se a redução da inflamação no sistema nervoso central, comprovada pela análise do infiltrado celular na medula espinhal (Figura 2), era devida a um menor recrutamento (migração) de leucócitos para esse local. A técnica da microscopia intravital foi utilizada para se ter acesso às imagens dos vasos sanguíneos irrigando as meninges que revestem a medula espinhal dos camundongos. No estudo anterior em que observamos a prevenção da EAE pela administração de *L.lactis* HSP65 10 dias antes da indução da doença, a microscopia intravital permitiu constatar menor frequência de leucócitos rolando e aderindo nos vasos que irrigam a meninge próxima à medula espinhal, permitindo afirmar, portanto, que a migração celular fica reduzida. (GUIMARAES, 2013). Ou seja, o principal mecanismo envolvido na inibição da EAE parecia ser a prevenção do recrutamento das células inflamatórias para a medula espinhal, mais que a inibição dessas células no local. No presente estudo, restava a dúvida se este também seria um mecanismo relevante para a inibição da doença uma vez que a indução das células T reguladoras possivelmente envolvidas ocorreria em momentos mais tardios, quando alguns leucócitos já estariam em processo de migração para a medula espinhal.

Para responder a essa dúvida, foi utilizada também a microscopia intravital. Os camundongos foram tratados com *L.lactis* produtor de HSP65 a partir do 4º dia após a imunização e, no 14º dia, foram anestesiados e mantidos vivos para a realização da técnica. Pelo fato de que alguns animais durante o procedimento tiveram os batimentos cardíacos reduzidos, nem todos os vídeos obtidos puderam ser utilizados para a análise estatística. Entretanto, somando os dados obtidos com o que pôde ser visualizado qualitativamente, observamos que os animais do grupo tratado com *L.lactis* HSP65 apresentava um número menor de células em rolamento e adesão nos vasos. O experimento será repetido para validação estatística já que, como o número de animais foi reduzido, não observamos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos e somente podemos afirmar que houve uma tendência de diferença.

No estudo anterior, foram avaliados ainda a participação dos receptores de quimiocina CXCR3 e CCR6, e as integrinas  $\alpha 4\beta 7$  e  $\alpha L\beta 1$  na modulação da migração dos leucócitos no modelo de encefalomielite (GUIMARAES, 2013). A frequência de células CD4+ expressando os receptores de quimiocinas CCR6 e CXCR3, bem como a intensidade da sua expressão nessas células foram avaliadas no baço e nos linfonodos mesentéricos no 4º dia após a indução doença. Esses dois receptores são descritos como receptores importantes para a migração de células encefalitogênicas na EAE, sendo o CCR6 relacionado à migração de células Th1 (SORENSEN *et al*, 2002) e o CXCR3 relacionado à migração das células Th17 (REBOLDI *et al*, 2009), embora esse último possa ter ação reguladora na EAE, pois células encefalitogênicas que o expressam têm maior dificuldade para entrar no parênquima do sistema nervoso central, restringindo as lesões às regiões perivasculares (MULLER *et al*, 2003). Observamos um aumento na frequência das células CD4+LAP-CXCR3+ tanto no baço quanto nos linfonodos cervicais, indicando uma possível ação reguladora do CXCR3 nessas células potencialmente efetoras. A frequência das células CD4+LAP-CCR6+ estava reduzida no baço. Esse resultado é consistente com o fato de que células T CD4+LAP- expressando CCR6 podem ter um papel inflamatório na EAE.

No estudo analisando o efeito da administração de *L.lactis* HSP65 antes da indução da EAE, as integrinas também foram analisadas no pico das manifestações clínicas da doença 14º dia. As integrinas  $\alpha 4\beta 1$  (CD49dCD29) e a  $\alpha L\beta 2$  (CD11aCD18) são expressas pelas células T CD4+ encefalitogênicas e auxiliam na sua entrada no sistema nervoso central (KERFOOT; KUBES, 2002; LASCHINGER *et al*, 2002). No baço, houve redução das células CD4+Foxp3-LAP-CD49d+. A redução dessas células potencialmente efetoras pode ser uma forma de prevenir o infiltrado inflamatório na medula espinhal. Ao mesmo tempo, houve um aumento na

freqüência de células CD4+Foxp3-LAP+CD11a+. Esses dados sugerem que as células T CD4+Foxp3-LAP+CD11a+ migrem para a medula espinhal e não se pode descartar a possibilidade da participação dessas células T reguladoras no controle da inflamação no sistema nervoso central.

A análise da expressão dessas moléculas nas células T CD4+ ativadas e nas células T reguladoras ainda não foi realizada, mas pretendemos fazê-la para entender se a expressão dessas moléculas auxilia no controle da inflamação. O estudo sobre migração celular nesse modelo deverá levar em consideração também a expressão de outras moléculas como CCR7 e LFA-1 que são importantes para a entrada das células nos órgãos linfoides secundários. A ativação dos linfócitos nesses órgãos induz a mudança do padrão de expressão de moléculas de migração. A expressão de CCR10, CCR4, selectinas P e E,  $\alpha 4\beta 7$  e CCR9 facilita a saída dessas células e seu direcionamento para as mucosas e para áreas cronicamente inflamadas (MASOPUST; SCHENKEL, 2013). O estudo dessas e de outras moléculas, associadas à expressão de Foxp3 e LAP, pode auxiliar no entendimento dos mecanismos envolvidos na ação dos circuitos ativados pela administração oral de *L.lactis* antes e durante o desenvolvimento da EAE de modo a modular a migração de leucócitos inflamatórios para a medula espinhal.

Enfrentamos muitos desafios nos confrontamos durante a realização desse trabalho. Primeiramente, ao trabalharmos com uma bactéria geneticamente modificada, duas variáveis precisavam ser controladas: a própria bactéria, cuja viabilidade e crescimento tinham de ser sempre monitorados, assim como a expressão da proteína HSP65. O próprio modelo de encefalomielite autoimune experimental apresentou certas dificuldades, visto que nem sempre a imunização tinha a mesma efetividade em todos os experimentos, e alguns tiveram que ser abortados antes do sacrifício. Observamos que a temperatura é um fator importante no desenvolvimento da doença e, como o nosso biotério experimental não conta com temperatura controlada, os escores clínicos nem sempre se repetiram ao longo do trabalho da tese.

Apesar das dificuldades e desafios deste trabalho, conseguimos mostrar que a administração oral de *L.lactis* produtora de HSP65 foi capaz de modificar o curso da EAE até 4 dias depois da sua indução. Embora nesse momento os sinais clínicos da doença ainda não sejam visíveis, o fato desse tratamento ter sido bem sucedido em animais dias após a indução da doença (quando muitos processos imunológicos já estão ocorrendo) abre um leque de oportunidades para o uso de metodologia semelhante a essa na clínica. Uma intervenção semelhante pode ser viável na modulação do desenvolvimento da doença em indivíduos

geneticamente suscetíveis permitindo a introdução de novas alternativas terapêuticas com baixo custo e poucos (se é que algum) efeitos colaterais.

## 8. PERSPECTIVAS

As principais perspectivas relativas a esse trabalho, no momento, estão no âmbito de explorar melhor alguns aspectos envolvidos no tratamento. Foi constatado que a tolerância oral com o *Lactococcus lactis* produtor de HSP65 de forma inequívoca funciona no modelo de tratamento da encefalomielite autoimune experimental nos camundongos C57BL/6. As células reguladoras, principalmente as com o fenótipo CD4<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> (independente do Foxp3) também se mostraram como muito importantes para o sucesso do tratamento. Portanto, no contexto já descrito, em que o fenômeno passa por um mecanismo de imunorregulação e não de imunossupressão, é necessário que realizemos algum experimento que comprove que esse perfil celular é de fato o fundamental. Uma opção seria o bloqueio dessas células com um anticorpo específico anti-LAP<sup>+</sup>, de forma semelhante ao que foi realizado no modelo preventivo. A separação dessas células por meio do *cell sorting* (com o Facs Aria II, presente no centro de citometria do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG) com posterior transferência delas para animais que tiveram a doença induzida, também mostra-se como uma opção viável para esse objetivo.

Da mesma forma como demonstramos no modelo preventivo, torna-se importante também demonstrar quais são as citocinas, quimiocinas e integrinas envolvidas nos órgãos linfoides secundários no modelo de tratamento. O estudo dos tipos celulares que migram para a medula espinhal poderia esclarecer se, além de um menor número, o grupo tratado também apresentaria uma mudança fenotípica nas células que infiltram esse local.

Embora os resultados que temos até agora indiquem uma semelhança muito grande com o modelo preventivo em todos os mecanismos, acreditamos que a incorporação desses experimentos ao trabalho de tratamento da EAE pode contribuir para adquirirmos novos conhecimentos sobre os mecanismos imunológicos envolvidos na indução de tolerância oral antes e depois da indução da EAE.

## 9. CONCLUSÃO

A utilização da tolerância oral com o *Lactococcus lactis* produtor de HSP65 foi eficiente no tratamento da encefalomielite autoimune experimental em camundongos C57BL/6. O tratamento iniciado no dia da imunização, e após 2 ou 4 dias, resultou em melhora nos sinais clínicos da doença. No 14º dia, pico da doença, quando os animais foram sacrificados, o grupo que previamente recebeu o *L.lactis* produtor de HSP65 apresentou menor infiltrado inflamatório na medula espinhal que o grupo que só recebeu meio M17 e semelhante ao dos animais *naive*. Esse efeito foi acompanhado de várias alterações em célula T CD4+ nos órgãos linfoides. No baço, o tratamento se associou à manutenção da frequência normal das células T CD4+ ativadas (enquanto no grupo controle ela foi reduzida), mas o perfil dessas células mudou, passando a apresentar maior frequência das células reguladoras CD4+Foxp3+ e CD4+LAP+. Já no linfonodo inguinal, o tratamento iniciado no dia da imunização se acompanhou de frequência da frequência de células T CD4+ ativadas. Da mesma forma que no baço, nos linfonodos mesentéricos, inguinais e cervicais, observou-se um aumento da frequência de células T CD4+ LAP+.

Através da microscopia intravital, observamos que os vasos próximos às meninges da medula espinhal também tinham menor número de células aderindo e rolando, comprovando que as células encefalitogênicas não chegam a migrar para as regiões próximas ao sistema nervoso central.

Portanto, o tratamento resulta em uma modulação das frequências de células T CD4+ nos órgãos linfoides secundários, atuando de forma a aumentar a frequência das células T reguladoras sem modificar a proporção de células T CD4+ ativadas e nem mesmo daquelas potencialmente patogênicas. O tratamento com *L.lactis* HSP65 mostrou-se portanto eficiente na modulação da doença prevenindo os danos inflamatórias na medula espinhal pela inibição da migração de leucócitos para esse local sem interferir com a células T CD4+ ativadas nos órgãos linfoides.

## 10. Referências Bibliográficas

- ANDALIB, A *et al.* Expression of Chemokine Receptors on Th1/Th2 CD4+ Lymphocytes in Patients with Multiple Sclerosis. *Iran.J.Immunol.* V.8, n.1, p.1-10, mar.2011.
- ANDRADE, M.C; VAZ, N.M; FARIA, A.M.F . Ethanol-induced colitis prevents oral tolerance induction in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, V. 36, n.9, p. 1227-1232, 2003.
- ASCHERIO, A; MUNGER, K.L. Environmental risk factors for multiple sclerosis. part I: the role of infection. *Annals of Neurology.* V.61, n.4, p.288-299, abr.2007a.
- ASCHERIO, A; MUNGER, K.L. Environmental risk factors for multiple sclerosis. part II: noninfectious factors. *Annals of Neurology.* V.61, n.6, p.504-513, jun.2007b.
- BACH, J.F. Infections and autoimmune diseases. *Journal of autoimmunity.* V.25, Sup, p.74-80, 2005.
- BAILEY, S.L *et al.* CNS myeloid DCs presenting endogenous myelin peptides 'preferentially' polarize CD4+ TH-17 cells in relapsing EAE. *Nature immunology.* V.8, n.2, p.172-180, fev.2007.
- BAILEY-BUCKTROUT, S.L *et al.* Cutting edge: central nervous system plasmacytoid dendritic cells regulate the severity of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. V.180, n.10, p.6457-6461, mai.2008
- BENNETT, C; L *et al.* The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet.* V.27, n.1, p.20-21, jan.2001.
- BETTELLI, E *et al.* *Integrin alpha 4 differentially affect the migration of effector and regulatory T cells (P4113).* *The Journal of immunology.* V.133, n.10, 2013.
- BJARTMAR, C; YIN, X; TRAPP, B. Axonal pathology in myelin disorders. *Journal of Neurocytology.* V.28, n.4/5, p.383-395, abr,1999.
- BOLLYKY, P.L *et al.* CD44 costimulation promotes FoxP3+ regulatory T cell persistence and function via production of IL-2, IL-10, and TGF-beta. *Journal of immunology.* V.183, n.4, p.2232-2241, 2009.
- BROD, S.A *et al.* Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral administration of myelin antigens: IV. Suppression of chronic relapsing disease in the Lewis rat and strain 13 guinea pig. [\*Ann Neurol.\*](#) V.29, n.6, p.615-622, 1991.

- CARRIER, Y *et al.* Th3 cells in peripheral tolerance. I. Induction of Foxp3-positive regulatory T cells by Th3 cells derived from TGF-beta T cell-transgenic mice. *J Immunol.* V.178, n.1, p. 179-85, 2007.
- CHEN, M.L *et al.* Latency-Associated Peptide Identifies a Novel CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Regulatory T Cell Subset with TGFβ-Mediated Function and Enhanced Suppression of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol.* V.180, n.11,p.7327–7337, 2008.
- COELHO, V; FARIA, A.M.C. HSP60: issues and insights on its therapeutic use as an immunoregulatory agent. *Frontiers in immunology.* V.2, p.1-8, 2012.
- COHEN, I.R. Real and artificial immune systems: computing the state of the body. *Nature immunology.* V.7, p.569-574, 2007
- COHEN, I.R; YOUNG, D.B. Autoimmunity, microbial immunity and the immunological homunculus. *Immunology,* V.12, n.4, 1991
- COMI, G; RADAELLI, M; SORENSEN, P.S. Evolving concepts in the treatment of relapsing multiple sclerosis. *The lancet.* V.389, n.10076, p.1-7, abr.2017.
- CONDE, A. A.; STRANSKY, B; FARIA, A. M. C; VAZ, N. M. . Interruption Of Recently Induced Immune Responses By Oral Administration Of Antigen. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* V.31, n.3, p. 377-380, 1998.
- DENDROU, C.A; FUGGER, L; FRIESE, M.A. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nature reviews: immunology.* V15, n.9, p545-558, ago.2015.
- DIAS, A.T *et al.* Different MOG(35-55) concentrations induce distinguishable inflammation through early regulatory response by IL-10 and TGF-β in mice CNS despite unchanged clinical course. *Cellular immunology.* V.293, n.2, p.87-94, fev.2015.
- DOS SANTOS, A.C *et al.* Kinin B2 receptor regulates chemokines CCL2 and CCL5 expression and modulates leukocyte recruitment and pathology in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in mice. *Journal of neuroinflammation.* V.5, n.49, nov.2008.
- DUAN, W *et al.* Inducible CD4<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> regulatory T cells suppress allergic inflammation. *Journal of immunology.* V.187, n.12, 2011.
- DUTTA, R; TRAPP, B.D. Pathogenesis of axonal and neuronal damage in multiple sclerosis. *Neurology.* V.68, p.22-31, mai.2007.

- ELKORD, E *et al.* Helios, and not FoxP3, is the marker of activated Tregs expressing GARP/LAP. *Oncotarget*. V.6, n.24, 2015.
- ENGELHARDT, B. Immune cell entry into the central nervous system: Involvement of adhesion molecules and chemokines. *Journal of the Neurological Sciences*. V.274, n.1-2, p.23-36, Nov.2008
- FARIA A.M.C *et al.* Aging affects oral tolerance induction but not its maintenance in mice. *Mech Ageing Dev*. V.102, n.1, p.67-80, 1998.
- FARIA, A.M.C *et al.* Oral tolerance induced by continuous feeding: enhanced up-regulation of transforming growth factor-beta/interleukin-10 and suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J.autoimmunity*. V.20, n.2, p.135-45, 2003
- FARIA, A.M.C; WEINER, H.L. Oral Tolerance and TGF- $\beta$  -Producing Cells. *Inflammation and allergy-drug targets*. V.5, n.3, p. 179-190, set.2006a
- FARIA, A.M.C; WEINER, H.L. Oral tolerance. *Immunological Reviews*. V.206, n.1 p 232–259, 2005.
- FARIA, A.M.C; WEINER, H.L. Oral tolerance: Therapeutic implications for autoimmune diseases. *Clinical & Developmental Immunology*. V.13, n.2–4, p.143–157, 2006b
- FEDER, M.E; HOFMANN, G.E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol*. V.61, p.243-82, 1999.
- FLEMING, J.O; COOK, T.D. Multiple sclerosis and the hygiene hypothesis. *Neurology*. V.67, n.11, p.2085-2086, 2006.
- FONTENOT, J.D *et al.* Regulatory T Cell Lineage Specification by the Forkhead Transcription Factor Foxp3. *Immunity*. V.22, n.3, p.329-341, mar.2005
- FOX, R.J *et al.* Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis. *N.Eng.J.Med*. V.367, n.12, p.98-107, 2012.
- FRIESSE, M.A; FUGGER, L. Pathogenic CD8<sup>+</sup> T cells in multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, V.66, n.2, p.132-141, ago.2009.
- FRISCHER J.M *et al.* The relation between inflammation and neurogeneration in multiple sclerosis brains. *Brain*. V.132, n.5, p.1175-1189, mai.2009.
- GANDHI, R; LARONI, A; WEINER, H.L. Role of the innate immune system in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. V.221, n.1-2, p.7-14, abr.2010.

- GEURTS, J.J; BARKHOF, F. Grey matter pathology in multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* V. 7, n.9, p.841-851, set.2008.
- GOMES-SANTOS, A.C *et al.* Hsp65-Producing *Lactococcus lactis* Prevents Inflammatory Intestinal Disease in Mice by IL-10- and TLR2-Dependent Pathways. *Frontiers in Immunology.* V. 8, p. 45-54, 2017.
- GOMES-SANTOS, A.C. Estratégias alternativas de imuno-modulação nas doenças inflamatórias intestinais. 2011. Tese (doutorado em bioquímica e imunologia). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2011;
- GUIMARÃES, M.A.F. *Efeitos do Lactococcus lactis* produtor de HSP65 no tratamento da encefalomielite autoimune experimental em camundongos. 2013. Dissertação (mestrado em bioquímica e imunologia). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2013.
- HAIDER, L *et al.* *Multiple sclerosis deep grey matter: the relation* between demyelination, neurodegeneration, inflammation and iron. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2014.
- HAINES, J.L *et al.* Linkage of the MHC to familial multiple sclerosis suggests genetic heterogeneity. *Human Molecular Genetics,* V.7, n87, p. 1229–1234, 1998.
- HARATS, D *et al.* Oral tolerance with heat shock protein 65 attenuates *Mycobacterium tuberculosis*-induced and high-fat-diet-driven atherosclerotic lesions. *Journal of the American college of cardiology.* V.40, n.7, p.1333-1338, out.2002.
- HART, B.A; GRAN, B; WEISSERT, R. EAE: imperfect but useful models of multiple sclerosis. *Trends in Molecular Medicine.* V.17, n.3, p.119-125, mar.2011
- HOLMAN, D.M; KLEIN, R.S; RANHOSOFF, R.M. The blood–brain barrier, chemokines and multiple sclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease.* V.1812, n.2, p.220-230, fev.2011
- HORI, S; NOMURA, T; SAKAGUCHI, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* V288, n.5609, p.1057-1061, fev.2003.
- HU, J; AUGUST, A. Naive and innate memory phenotype CD4+ T cells have different requirements for active Itk for their development. *Journal of immunology.* V.180, n.10, p.6544-6552, 2008.
- KAPPOS, L *et al.* *Clinical effects of natalizumab on multiple sclerosis appear early in treatment course.* *Journal of neurology.* V260, n.5, p.1388-1395, 2013.

- KAPPOS, L. *et al.* A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *The New England Journal of Medicine*, V.362, n.5, p.1-15, fev.2010.
- KERFOOT, S.M; KUBES, P. Overlapping roles of P-selectin and alpha 4 integrin to recruit leukocytes to the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* .V.169, n.2, p.1000-1006, 2002.
- KHOURY, S.J *et al.* Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral administration of myelin basic protein: III. Synergistic effect of lipopolysaccharide. *Cellular Immunology*. V.131, n.2, 302–310, 1990.
- KIHARA, Y *et al.* Dual phase regulation of experimental allergic encephalomyelitis by platelet-activating factor. *The journal of experimental medicine*. V.202, n.6, p.853-863, 2005.
- KING, I.L *et al.* Circulating Ly-6C<sup>+</sup> myeloid precursors migrate to the CNS and play a pathogenic role during autoimmune demyelinating disease. *Blood*. V.113, n.4, p.3190-3197, 2009.
- KOMIYAMA, Y *et al.* IL-17 Plays an Important Role in the Development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol*. V.177, p.566-573, 2006
- LASCHINGER, M *et al.* Encephalitogenic T cells use LFA-1 for transendothelial migration but not during capture and initial adhesion strengthening in healthy spinal cord microvessels in vivo. *Eur J Immunol*.V.32, n.12, p.3598-3606, 2002.
- LASSMANN, H; BRUCK, W; LUCCHINETTI, C.F. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol*. V.17, n.2, p.210-218, abr.2007.
- LIU, C-H *et al.* Cutting edge: dendritic cells are essential for in vivo IL-12 production and development of resistance against *Toxoplasma gondii* infection in mice. *The journal of immunology*, v.177, n.1, p.31-35, 2006.
- LIU, T *et al.* CD44 expression positively correlates with Foxp3 expression and suppressive function of CD4<sup>+</sup> Treg cells. *Biol direct*. V.4, n.40, 2009.
- LOMA, I; HEYMAN, R. Multiple Sclerosis: Pathogenesis and Treatment. *Current Neuropharmacology*. V.9, n.3, p.409-416, set.2011.
- LUBLIN, F.D *et al.* *Defining the clinical course of multiple sclerosis: The 2013 revisions*. *Neurology*. V.83, n.3, p.278-286, 2014.
- LUERCE, T.D *et al.* Anti-inflammatory effects of *Lactococcus lactis* NCDO 2118 during the remission period of chemically induced colitis. *Gut Pathogens*. V.6, p. 33, 2014.

- MARON, R et al. Mucosal administration of heat shock protein-65 decreases atherosclerosis and inflammation in aortic arch of low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation*. V.106, n.13, p.1708-1715, set.2002.
- MARQUES, P.E *et al.* Imaging liver biology in vivo using conventional confocal microscopy. *Nature protocol*, v.10, n.2, 2015.
- MASOPUST, D; SCHENKEL, J.M. The integration of T cell migration, differentiation and function. *Nature reviews immunology*. V.13, n.5, p.309-320, 2013.
- McDONALD, W.I; RON, M.A. Multiple sclerosis: the disease and its manifestations. *The real society*. V.354, n.1390, p.1615-1622, out.1999.
- McFARLAND, H.F; MARTIN, F. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nature immunology*. V.8, n.9, p.913-919, set.2007.
- MEDEIROS, S.R *et al.* Vitamin A supplementation leads to increases in regulatory CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> T cells in mice. *Nutrition*. V. 31, p. 1010, 2015.
- MENEZES, J. S *et al.* Stimulation by food proteins is critical for the maturation of the immune system. *International Immunology*. V. 15, n.3, p. 447-455, 2003.
- MULLER, M et al. CXCR3 signaling reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis by controlling the parenchymal distribution of effector and regulatory T cells in the central nervous system. *J Immunol*. V. 79, n.5, p.2774-2786, 2003.
- MURRAY, T.J. The history of multiple sclerosis: the changing frame of the disease over the centuries. *J Neurol Sci*. V.277, n.1, p.3-8, fev.2009.
- NAKAMURA, K; KITANI, A; STROBER, W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med*. V. 194, n.5,p. 629-644, 2001.
- OHKURA, N; KITAGAWA, Y; SAKAGUCHI, S. Development and maintenance of regulatory T cells. *Immunity*. V.38, n.3, p.414-423, mar.2013.
- OIDA, T *et al.* CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells that express latency-associated peptide on the surface suppress CD4<sup>+</sup>CD45RB high-induced colitis by a TGF-beta-dependent mechanism. *J Immunol*. V 170, n.5, p.2516-2522, 2003.
- PABST, O; MOWAT, A.M. Oral tolerance to food protein. *Mucosal Immunol*. V. 5, n.3,p. 232-239, 2012.
- PENDER, M.P; GREER, J.M. Immunology of multiple sclerosis. *Curr. Allergy. Asthma. Rep*. V.7, n.4, p.285-292, jul.2007.

- PERÓN, J.P *et al.* Oral tolerance reduces Th17 cells as well as the overall inflammation in the central nervous system of EAE mice. *J Neuroimmunol.* V.227, n.1-2, p.10-17, 2010.
- PHILLIPS, M.J *et al.* Role of cervical lymph nodes in autoimmune encephalomyelitis in the Lewis rat. *The journal of pathology.* V.182, n.4, p.457-464, 2011.
- QUINTANA, F.G; COHEN, I.R. The HSP60 immune system network. *Trends in Immunology.* V.32,n.2,p. 89-95, 2010
- REBOLDI, A *et al.* 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.*V.10, n.5, p. 514-23, 2009.
- REIS, B.S; MUCIDA, D. The Role of the Intestinal Context in the Generation of Tolerance and Inflammation. *Clinical and Developmental Immunology.* V.2012, p.1-8, 2011
- REZENDE, R.M *et al.* Hsp65-producing *Lactococcus lactis* prevents experimental autoimmune encephalomyelitis in mice by inducing CD4<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> regulatory T cells. *Journal of autoimmunity,* V.40, p.45-47, 2013.
- RIOS, M.J.C *et al.* Tolerance Induction And Immunological Priming Initiated By Oral Contacts With Protein Antigen In Inbred Strains Of Mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* V21, p. 825-836, 1988.
- ROCCA, M.A *et al.* Clinical and imaging assessment of cognitive dysfunction in multiple sclerosis. *The lancet: neurology.* V.14, n.3, p.302-317, mar.2015
- RUBIN, K; GLAZER, S. The potential role of subclinical *Bordetella Pertussis* colonization in the etiology of multiple sclerosis. *Immunobiology.* V.221, n.4, p.512-515, abr.2016.
- SAKAGUCHI, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol.* V.6, n.4, p.345-352, abr.2005.
- SELLI, M.E *et al.* Autoimmunity to hsp60 during diet induced obesity in mice. *International journal of obesity,* V.41, n.2, p.348-351, fev.2017
- SILVA, G.G. Administração de *Lactococcus lactis* produtor de HSP65 como alternativa imuno-moduladora em modelo experimental de artrite. 2017. Tese (Doutorado em Bioquímica e Imunologia) - Universidade Federal de Minas Gerais,

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais. Orientador: Ana Maria Caetano de Faria.

- SORENSEN, T.L *et al.* Multiple sclerosis: a study of CXCL10 and CXCR3 co-localization in the inflamed central nervous system. *J Neuroimmunol.* V.127, n.1-2, p.59-68, 2002
- SOSPEDRA, M; MARTIN, R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu. Rev. Immunol.* V.23, p.683-747, 2005.
- SOULILLOU, J.P. *Missing links in multiple sclerosis etiology. A working connecting hypothesis. Medical hypotheses.* V.80, n.5, p.509-516, 2013.
- SOUZA, B.M *et al.* Lactococcus lactis carrying the pValac eukaryotic expression vector coding for IL-4 reduces chemically-induced intestinal inflammation by increasing the levels of IL-10-producing regulatory cells. *Microbial Cell Factories.* V. 15, p. 150-157, 2016.
- STROMNES, I.M *et al.* Differential regulation of central nervous system autoimmunity by TH1 and TH17 cells. *Nature medicine.* V.14, n.3, mar.2008.
- SWAROOP, S *et al.* HSP60 plays a regulatory role in IL-1 $\beta$ -induced microglial inflammation via TLR4-p38 MAPK axis. *Journal of neuroinflammation.* V.13, n.27, fev.2016
- THORNTON, A; M. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3<sup>+</sup> T regulatory cells. *J Immunol.* V. 184, n.7, p.3433-3441, abr.2010.
- TRAPP, B.D; NAVE, K.A. Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder? *Annu Rev Neurosci.* V.31, n.1, p.247-269, 2008.
- TSAN, M; GAO, B. Heat shock proteins and immune system. *Journal of Leukocyte Biology.* V,85,p.905-910, 2009.
- VAZ, N. M *et al.* Maturity, Ageing And Oral Tolerance. *Scandinavian Journal of Immunology.* V.46, p. 225-229, 1997.
- VAZ, N.M *et al.* Inhibition of homocytotropic antibody formation in adult inbred mice by previous feeding of protein antigens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.*V.60, p.110-115, 1977
- VAZ, N.M; FARIA, A.M.C. *The Construction Of Immunological Identity.* Ciência e cultura. V.42, n.7, p.430-444, 1990.

- WALCZAK, A *et al.* *Transdermal application of myelin peptides in multiple sclerosis treatment. JAMA Neurol.* V.70, n.9, p.1105-1109, 2013.
- WEINER, H.L. *et al.* Oral tolerance. *Immunol Rev.* V.241, n.1, p.241-259, 2011.
- WEINER, H.L. The Challenge of Multiple Sclerosis: How Do We Cure A Chronicheterogeneous disease? *Annals of Neurology.* V.65, n.3, p.239-248, mar.2009.
- WEINER, H.L. Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes Infect.* V.3, n.11, p.947-954, 2001
- WINKELMANN, A *et al.* *Multiple sclerosis treatment and infectious issues: update 2013. Clin.exp.immun.* V.157, n.3, p.425-438, 2014.
- WOJKOWSKA, D.W *et al.* *Interactions between Neutrophils, Th17 Cells, and Chemokines during the Initiation of Experimental Model of Multiple Sclerosis. Mediators of inflammation,* 2014.
- WOWK, P.F *et al.* Mycobacterial Hsp65 antigen upregulates the cellular immune response of healthy individuals compared to tuberculosis patients. *Human vaccines and immunotherapeutics.* P1-11, jan.2017
- ZANIN-ZHOROV, A *et al.* Heat shock protein 60 enhances CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cell function via innate TLR2 signaling. *J Clin Invest.* V.116, n.7, p. 2022–2032, 2006