

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA**

**BRUNO CABRAL DE LIMA OLIVEIRA**

**Papel de SOCS2 e NLRP3 na Encefalomielite Autoimune Experimental**

**Orientadora: Fabiana Simão Machado**

Belo Horizonte

2015

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA**

**BRUNO CABRAL DE LIMA OLIVEIRA**

**Papel de SOCS2 e NLRP3 na Encefalomielite Autoimune Experimental**

**Orientadora: Fabiana Simão Machado**

Tese apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Bioquímica e Imunologia

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

Belo Horizonte

2015

## **Agradecimentos:**

Agradeço especialmente à minha família. Meus pais Rosângela Cabral e Luiz Carlos Eufrazio; também à minha irmã Camila Cabral, pelo apoio incondicional.

De forma especial à minha orientadora, professora Fabiana Simão Machado, por todo aprendizado, amizade e convivência.

Aos amigos que considero especiais, Allysson Cramer, Andreia Barroso e Pollyana Pimentel, pelo companheirismo de sempre.

Aos colegas de laboratório, Ana Carolina, Cynthia Honorato, Diego Rodney, Fátima Brant, Isabela Avellar, Jacqueline Barbosa, Julia Castro, Katherine Manrique, Lísia Esper, Lorryne Souza, Melisa Gualdron, Paulo Gaio, Renata Monti e Ronan Ricardo por toda ajuda e convivência.

Ao David Henriques, pela participação ativa no projeto. Também à professora Ana Maria e ao Rafael Rezende, pelos experimentos preliminares.

À professora Milene Rachid, pela ajuda nas análises histológicas

A todo o grupo Imunofarmacologia, professores, alunos e técnicos, pela colaboração imprescindível neste projeto.

Aos colegas da Duke University. Professora Mari Shinohara, Makoto Inoue, Masashi Kanayama, Keiko Danzaki, Shengje Xu, Kendra Moore, Kristen Gorman, William Backallar e Jason Ashe.

A todos que participaram de alguma forma desse trabalho

Aos professores da banca examinadora, que aceitaram colaborar com a defesa

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG

## Resumo

Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE) é o modelo animal mais usado para o estudo de esclerose múltipla (EM), uma doença inflamatória do sistema nervoso central (SNC). A família de proteínas dos supressores da sinalização de citocinas desempenha papel crítico na regulação das respostas de citocinas. SOCS2 é conhecido por ser um modulador importante de respostas fisiológicas e na patogênese de determinadas doenças infecciosas e alérgicas. O papel de SOCS2 durante EAE ainda não foi explorado. EAE foi induzida em camundongos WT e SOCS2 deficientes ( $^{-/-}$ ), utilizando glicoproteína da mielina de (MOG<sub>35-55</sub>). Amostras de cérebro e medula espinhal foram examinadas durante o pico (dia 14) e fase de recuperação (dia 28) da doença. SOCS2 é regulado positivamente em cérebro de camundongos WT após a indução da EAE e animais SOCS2 $^{-/-}$  são mais resistentes ao desenvolvimento de fase aguda. O atraso dos sinais graves da doença em camundongos SOCS2 $^{-/-}$  foi associado com diminuição da expressão da 5-LO, AhR e IRF1 no cérebro, redução da frequência de células T inflamatórias (IFN- $\gamma^+$  e IL-17 $^+$ ) e modulação de citocinas no cérebro e medula espinhal. No entanto, enquanto que nos camundongos WT a escala clínica máxima de EAE foi seguida por uma recuperação progressiva, camundongos SOCS2 $^{-/-}$  foram incapazes de recuperar-se dos danos locomotores que ocorreram durante a fase aguda, o que foi associado maior inflamação no SNC, resultando em uma resposta inflamatória prolongada na fase tardia da EAE. Nós também demonstramos que a atividade NLRP3 especificamente no SNC é um fator amplificador de EAE. NLRP3 é expresso e funcional em micróglia, mas não em astrócitos. Além disso, células F4/80+ de órgãos linfóides periféricos de animais com EAE são capazes de ativar NLRP3 em micróglia *in vitro*, mas não o fazem em astrócitos. Mostrou-se também que a micróglia produz de forma mais eficiente IL-1 $\beta$  após co-cultura com os linfócitos Th17 na presença de MOG. Juntos, estes resultados sugerem que SOCS2 desempenha um papel duplo na resposta imune durante a EAE. É necessário para a indução da fase aguda, mas tem um papel crucial na benéfico a fase de recuperação da doença, controlando o componente regulador de EAE. Além do mais, a atividade específica de NLRP3 no SNC é um fator amplificador da severidade de EAE.

## Abstract

Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) is the most widely used animal model for the study of Multiple Sclerosis, an inflammatory disease of the central nervous system (CNS). Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS) family proteins play a critical role in regulating cytokine responses. SOCS2 is known to be a crucial modulator of physiological responses and in the pathogenesis of certain allergy and infectious diseases. The role of SOCS2 during EAE has not been explored yet. EAE was induced in WT and SOCS2 deficient ( $^{-/-}$ ) mice using Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein peptide (MOG<sub>35-55</sub>). Brain and spinal cord samples were examined during the peak (day 14) and recovery phase (day 28) of the disease. SOCS2 is upregulated in brain of WT mice after EAE induction and SOCS2 $^{-/-}$  mice were more resistant to acute phase development. The postponement of the first severe signs of the disease in SOCS2 $^{-/-}$  mice was associated with decreased expression of 5-LO, AhR and IRF1 in the brain and reduced frequency of inflammatory T cells (IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> and IL-17<sup>+</sup>) and modulation of cytokines in the brain and spinal cord. However, while in WT mice maximal clinical EAE score was followed by a progressive recovery, the SOCS2 $^{-/-}$  mice were unable to recover from the locomotor damage that occurred during the acute phase, which was associated with greater inflammation in the CNS, resulting in a prolonged inflammatory response in the late phase of EAE. We also demonstrate that NLRP3 activity specifically in the CNS is an amplifier factor of EAE. NLRP3 is expressed and functional in microglia, but not in astrocytes. Furthermore, F4/80<sup>+</sup> cells from peripheral organs from animals with EAE are able to activate microglia NLRP3 *in vitro*, but do not in astrocytes. It was also shown that microglia produce more efficiently IL-1 $\beta$  after co-culture with lymphocytes Th17 in the presence of MOG. Altogether, these results suggest that SOCS2 plays a dual role in the immune response during EAE. It is necessary for induction of the acute phase but plays a crucial beneficial role in the recovery stage of the disease by controlling the regulatory component of EAE. In addition, NLRP3 specific activity in the CNS is an important factor for severity of disease.

## Lista de abreviaturas

5-LO= 5 lipoxigenase

AhR= *aryl hydrocarbon receptor*/ receptor de aril hidrocarbono

APC= *antigen presenting cell*/ célula apresentadora de antígeno

ARNT= *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*/ translocador nuclear do receptor de aril hidrocarbono

ASC= *apoptosis-associated-speck-like protein containing a CARD*/ proteína semelhante a partícula associada a apoptose contendo um CARD

ATP= adenosina Tri fosfato

BHE= barreira hemato-encefálica

CFA= *complete Freund's adjuvant*/ adjuvante completo de Freund

DAMP= *danger-associated molecular pattern*/ padrão molecular associado ao perigo

EAE= encefalomielite autoimune experimental

EDTA= *ethylenediamine tetraacetic acid*/ ácido etilenodiamino tetra-acético

EM= esclerose múltipla

FICZ= *6-formylindolo[3,2-b]carbazole*/ 6-formilindol[3,2-b] carbazona

GFAP= *glial fibrillary acid protein*/ proteína glial ácida fibrilar

GH= *growth hormone*/ hormônio do crescimento

HLA= *human leucocyte antigen*/ antígeno leucocitário humano

IBA-1= *ionized calcium-binding adapter molecule 1*/molécula adaptadora 1 de ligação a cálcio ionizado

ICAM= *Intercellular adesion molecule*/ molécula de adesão celular

IFN= interferon

IL- interleucina

IRF-1= *interferon regulatory factor 1*/ fator regulatório de interferon 1

JAK= *Janus protein kinase*/ proteína quinase Janus

KIR= *kinase inhibitory region*/ região inibitória de quinase

LPS= lipopolissacarídeo

LTA<sub>4</sub>= leucotrieno A<sub>4</sub>

LXA<sub>4</sub>= lipoxina A<sub>4</sub>

MHC= *major histocompatibility complex*/ complexo de histocompatibilidade principal

MOG= *myelin oligodendrocyte glycoprotein*/ glicoproteína da mielina de oligodendrócito

NaCl= cloreto de sódio

NF- $\kappa$ B= *nuclear factor kappa B*/ fator nuclear kapa B

NLR= *nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor*/ receptor semelhante ao domínio de oligomerização da ligação a nucleotídeo (NOD)

NLRP= *NOD-like receptor containing pyrin domain 3*/ receptor semelhante a NOD contendo um domínio de pirina 3

OPD= *o-phenylenediamine*/ o-fenilenodiamina

PAMP= *pathogen-associated molecular pattern*/ padrão molecular associado ao patógeno

PBS= *phosphate buffer saline*/tampão fosfato salina

PBM= proteína básica de mielina

PMSF= *phenylmethylsulfonyl Fluoride*/fluoreto de fenilmetilsufonila

PRR= *pattern recognition receptor*/ receptor de reconhecimento padrão

ROS= *reactive oxygen species*/ espécies reativas de oxigênio

SFB= soro fetal bovino

SNC= sistema nervoso central

SOCS= *suppressor of cytokine signaling*/ supressor da sinalização de citocina

STAT= *signal transduction and activator of transcription*/ativador da transcrição e ativação do sinal

TCDD= *2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin*/ 2,3,7,8- tetraclorodibenzeno-p-dioxina

TGF- $\beta$ = transformin growth fator- $\beta$ / fator transformante do crescimento  $\beta$

Th= *T helper cell*/célula T auxiliar

TLR= *Toll-like receptor*/ receptor semelhante ao Toll

TNF- $\alpha$ = *tumor necrosis factor  $\alpha$* / fator de necrose tumoral  $\alpha$

Treg= célula T reguladora

VCAM1= *vascular-cell adhesion molecule 1*/ molécula de adesão da célula vascular 1

## Lista de figuras

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Distribuição da prevalência de esclerose múltipla em diferentes áreas do planeta .....   | 16 |
| Figura 2. Estrutura das proteínas SOCS .....   | 37 |
| Figura 3. Expressão de SOCS2 no cérebro de animais induzidos por EAE .....   | 54 |
| Figura 4. Desenvolvimento de EAE em animais WT e SOCS2 <sup>-/-</sup> .....  | 56 |
| Figura 5. Expressão de 5-LO e AhR no cérebro de animais WT e SOCS2 <sup>-/-</sup> 14 dias após indução de EAE .....  | 57 |
| Figura 6. Camundongos AhR <sup>-/-</sup> são altamente resistentes ao desenvolvimento de EAE na fase de pico da doença .....                                 | 58 |
| Figura 7. A ausência de SOCS2 resulta em redução da inflamação no SNC durante a fase de pico da EAE .....  | 60 |
| Figura 8. O perfil de inflamação no SNC dos animais reflete nos aspectos físicos dos mesmos .....  | 61 |
| Figura 9. Animais AhR <sup>-/-</sup> apresentam inflamação discreta a moderada na medula espinhal 14 dias após imunização com MOG .....                      | 62 |
| Figura 10. SOCS2 regula o infiltrado de linfócitos no SNC durante EAE .....  | 63 |
| Figura 11. Níveis de citocinas no cérebro de animais SOCS2 no pico de EAE .....  | 64 |
| Figura 12. A deficiência de AhR altera a produção de IL-17 nos animais 14 dias após a indução .....  | 65 |
| Figura 13. O cérebro de animais SOCS2 <sup>-/-</sup> apresenta alteração no nível de CCL-5 na fase de pico da doença .....                                   | 66 |
| Figura 14. Produção esplênica de citocinas e quiocinas em 14 dpi .....   | 67 |
| Figura 15. Produção tímica de citocinas e quiocinas em 14 dpi .....  | 68 |
| Figura 16. A produção de IRF-1 é reduzida com a ausência de SOCS2 durante EAE ..   | 69 |
| Figura 17. Ausência de SOCS2 está relacionada com alteração da população de células T IFN $\gamma$ <sup>+</sup> no baço. ....                                | 70 |
| Figura 18. Camundongos SOCS2 <sup>-/-</sup> apresentam deficiência na geração esplênica de células inflamatórias nos estágios clínicos iniciais de EAE ..... | 71 |
| Figura 19. SOCS2 é crucial para o processo de remissão dos sinais clínicos. ....   | 72 |
| Figura 20. Animais deficientes de AhR são resistentes a EAE .....  | 74 |



|  |                                      |
|--|--------------------------------------|
| Figura 21. Animais SOCS2 <sup>-/-</sup> apresentam elevado nível de inflamação no SNC durante fase tardia de EAE.....  | 75                                   |
| Figura 22. Camundongos SOCS2 <sup>-/-</sup> possuem maior dificuldade locomotora 28 dias após imunização. ....   | 76                                   |
| Figura 23. A população de linfócitos T ativados é aumentada no SNC de animais SOCS2 <sup>-/-</sup> na fase tardia de EAE. ....                                 | 78                                   |
| Figura 24. O baço deficiente de SOCS2 produz mais linfócitos T na fase tardia de EAE. ....   | 79                                   |
| Figura 25. Produção de fatores inflamatórios no cérebro dos animais em 28 dpi .....  | 80                                   |
| Figura 26. BMDM secretam altos níveis de IL-1 $\beta$ e caspase-1 clivada após estímulo com ATP. ....  | <b>Erro! Indicador não definido.</b> |
| Figura 27. ATP induz a formação dos specks de NLRP3 em BMDM.....   | 81                                   |
| Figura 28.A atividade de NLRP3 é importante para a amplificação da severidade de EAE .....   | 83                                   |
| Figura 29.Micróglia produz IL-1 $\beta$ e caspase-1 após estímulo com ATP .....  | 85                                   |
| Figura 30. O inflamassoma NLRP3 é ativado em micróglia após estímulo com ATP... ..   | 86                                   |
| Figura 31.Astrócitos não produzem IL- $\beta$ e caspase-1 após estímulo com ATP .....  | 87                                   |
| Figura 32.Astrócitos não expressam NLRP3 e ASC mesmo após estímulo com ATP ..  | 88                                   |
| Figura 33.Células dos órgãos linfóides periféricos de animais com EAE apresentam ativação de NLRP3 e aparentemente interagem com células da glia .....         | 89                                   |
| Figura 34. Uma hora de co-cultura com células de órgãos linfóides de camundongos com EAE não é suficiente para gerar formação de specks em micróglia.....      | 91                                   |
| Figura 35.Micróglia não apresentam formação dos specks de NLRP3 em uma hora de incubação mesmo em co-cultura com maior número de células de animais com EAE .. | 93                                   |
| Figura 36.Há montagem do complexo NLRP3 em micróglia após 3 horas de co-incubação com células periféricas de animais induzidos por EAE .....                   | 94                                   |
| Figura 37.NLRP3 também é ativado em micróglia após 3 horas de co-incubação com maior número de células periféricas de animais com EAE .....                    | 96                                   |
| Figura 38.Não há ativação do complexo NLRP3 em astrócitos após 1 hora de co-cultura com células provenientes de camundongos com EAE .....                      | 97                                   |

|   |     |
|---|-----|
| Figura 39. Astrócitos não apresentam expressão/ativação de NLRP3 mesmo durante co-cultura por 1 hora com maior número de células de animais com EAE ..... | 99  |
| Figura 40. Não ocorre ativação do inflamassoma NLRP3 em astrócitos em co-cultura por 3 horas com células isoladas de animais com EAE .....                | 100 |
| Figura 41. Astrócitos não apresentam expressão/ativação de NLRP3 mesmo em co-cultura com maior número de células provenientes de animais imunizados ..... | 102 |
| Figura 42. Ambiente com a presença de linfócitos Th17 e MOG induz maior produção de IL-1 $\beta$ por BMDM e micróglia .....                               | 103 |

## Sumário

|  |    |
|--|----|
| <b>1. Introdução</b> .....   | 15 |
| 1.1. Esclerose Múltipla .....  | 15 |
| 1.2. Encefalomielite autoimune experimental (EAE) .....  | 19 |
| 1.3. Esclerose múltipla e EAE: similaridades e discrepâncias.....  | 21 |
| 1.4. Resposta imune e desenvolvimento da esclerose múltipla e EAE .....  | 24 |
| 1.4.1. Imunidade inata .....   | 24 |
| 1.4.2. Receptores de reconhecimento padrão: inflamassomas .....  | 26 |
| 1.4.3. O Inflamassoma NLRP3, esclerose múltipla e EAE.....   | 29 |
| 1.4.4. Importância de linfócitos T helper (Th)1 e Th17 no desenvolvimento da EAE<br>30                                     |    |
| 1.4.5. Mecanismos de regulação/resolução.....  | 34 |
| 1.5. Família de proteínas supressoras da sinalização de citocinas ( <i>Suppressors of Cytokine Signaling: SOCS</i> ) ..... | 36 |
| 1.5.1. A proteína SOCS2 .....  | 38 |
| 1.5.2. A expressão de SOCS2 e a via 5-Lipoxigenase (5-LO) / Receptor Aril Hidrocarbono (AhR) .....                         | 40 |
| <b>2. Objetivos</b> .....  | 43 |
| 2.1. Objetivo geral .....  | 43 |
| 2.2. Objetivos específicos.....  | 43 |
| <b>3. Material e métodos</b> .....   | 44 |
| 3.1. Animais.....  | 44 |
| 3.2. Indução e avaliação diária de EAE.....  | 44 |
| 3.3. ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) .....   | 45 |
| 3.4. Histologia.....   | 47 |
| 3.5. Citometria de fluxo.....  | 48 |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.6. Western blotting .....  | 48        |
| 3.7. Cultura de células BMDM ( <i>Bone Marrow-Derived Macrophage</i> : macrófagos derivados da medula óssea) ..... | 49        |
| 3.8. Cultura primária de glia e isolamento de micróglias e astrócitos .....  | 50        |
| 3.9. Quimeras .....  | 51        |
| 3.10. Co-cultura de BMDM, micróglia ou astrócitos com células Th1 ou Th17 polarizadas <i>in vitro</i> .....        | 52        |
| 3.11. Microscopia confocal .....   | 52        |
| 3.12. Co-cultura de esplenócitos de camundongos naïve ou EAE com micróglia ou astrócitos .....                     | 53        |
| 3.13. Análises estatísticas .....  | 53        |
| <b>4. Resultados</b> .....   | <b>54</b> |
| 4.1. Efeitos de SOCS2 na fase inicial de EAE .....   | 54        |
| 4.2. A expressão de SOCS2 é associada com a expressão de 5-LO/AhR durante EAE                                      | 56        |
| 4.3. SOCS2 regula a inflamação no SNC dos camundongos durante a fase aguda de EAE                                  | 59        |
| 4.4. A deficiência de SOCS2 resulta em alteração do infiltrado de linfócitos T no SNC                              | 62        |
| 4.5. SOCS2 regula a secreção de importantes citocinas no SNC durante EAE .....                                     | 64        |
| 4.6. A produção de CCL-5 é diminuída no cérebro de camundongos deficientes de SOCS2 .....                          | 65        |
| 4.7. A ausência de SOCS2 altera a produção periférica de citocinas e quimiocinas                                   | 66        |
| 4.8. SOCS2 regula a expressão do Fator Regulatório de Interferon 1 (IRF-1) durante EAE                             | 68        |
| 4.9. A geração/expansão de células T no baço é alterada em animais deficientes de SOCS2 .....                      | 69        |

|   |            |
|---|------------|
| 4.10. Camundongos SOCS2 <sup>-/-</sup> têm deficiência na geração de células T inflamatórias nos estágios clínicos iniciais da EAE .....    | 70         |
| 4.11. A ausência de SOCS2 é benéfica no início da EAE, porém prejudicial na fase de recuperação da doença.....                              | 71         |
| 4.12. O SNC de animais SOCS2 <sup>-/-</sup> na fase tardia de EAE apresenta perfil inflamatório inverso do apresentado na fase de pico..... | 74         |
| 4.13. A população de células T inflamatórias é aumentada no SNC de animais SOCS2 <sup>-/-</sup> na fase tardia de EAE .....                 | 76         |
| 4.14. O baço deficiente de SOCS2 produz mais linfócitos T IL-17+ e FoxP3+ na fase tardia de EAE .....                                       | 78         |
| 4.15. Fatores inflamatórios são elevados no cérebro de animais SOCS2 <sup>-/-</sup> 28 dias após a indução de EAE.....                      | 79         |
| 4.16. O inflamassoma NLRP3 é fortemente responsivo ao estímulo de ATP em macrófagos derivados da medula óssea (BMDM) .....                  | 81         |
| 4.17. A atividade do inflamassoma NLRP3 no SNC é um fator que amplifica a severidade de EAE.....  | 84         |
| 4.18. Atividade de NLRP3 em micróglia após estímulo com ATP .....   | 85         |
| 4.19. De forma diferente de micróglia, os astrócitos não apresentam ativação do inflamassoma após tratamento com ATP .....                  | 88         |
| 4.20. Células de animais com EAE apresentando ativação de NLRP3 aparentemente interagem com micróglia em co-cultura.....                    | 90         |
| 4.21. Células de órgãos linfóides periféricos de animais imunizados induzem ativação de NLRP3 em micróglia.....                             | 92         |
| 4.22. Astrócitos não apresentam ativação do inflamassoma NLRP3 em co-culturas com células de animais induzidos por EAE .....                | 98         |
| 4.23. A presença de linfócitos Th17 na presença de MOG induz maior secreção de IL-1 $\beta$ por micróglia.....                              | 104        |
| <b>5. Discussão .....</b>   | <b>106</b> |

|                                     |                                      |
|-------------------------------------|--------------------------------------|
| 6. Conclusões.....                  | 121                                  |
| 7. Referências Bibliográficas ..... | 122                                  |
| 8. Anexos .....                     | <b>Erro! Indicador não definido.</b> |

## 1. Introdução

### 1.1. Esclerose Múltipla

A esclerose múltipla (EM) é uma doença neurodegenerativa grave de caráter inflamatório crônico desmielinizante que afeta o sistema nervoso central (SNC), podendo múltiplas áreas serem danificadas pela inflamação (Ransohoff, Hafler *et al.* 2015). A doença foi primeiramente descrita pelo neurologista francês Jean-Martin Charcot no ano de 1868 através de descrições prévias e também suas observações em pacientes com o problema. Tais observações do médico francês deram origem ao nome da doença (Moreira, Tilbery *et al.* 2002) . Mesmo sendo descoberta ainda no século XIX, a etiologia da doença ainda não é conhecida, porém é consenso que este processo seja resultado de multiplicidade de fatores, como aqueles genéticos, ambientais e infecções. Os fatores genéticos não são muito bem compreendidos, mas alguns genes são relacionados com a doença, como o gene para HLA (*Human Leucocyte Antigen* : antígeno leucocitário humano), e aqueles para os receptores de Interleucina (IL) 17 (IL-17) e IL-12 (Svejgaard 2008; Sawcer e Hellenthal 2011). A predisposição genética parece ser um fator relevante, uma vez que parentes próximos de pacientes apresentam maior incidência da EM, podendo chegar a 15 a 30 vezes maior a possibilidade de desenvolver a doença. A infecção pelo vírus Epstein-Barr também tem sido associada a esclerose múltipla nos pacientes, mas as bases moleculares desse processo ainda não estão claras. Entre os fatores ambientais, podemos destacar a baixa exposição a luz solar, diminuído nível de vitamina D e tabagismo (Ramagopalan, Dobson *et al.* 2010; Pender, Csurhes *et al.* 2014). Esses fatores resultam em maior incidência em países de clima temperado, principalmente aqueles acima da linha do Equador e com maior latitude (Figura 1) (Simpson, Blizzard *et al.* 2011).



**Figura 1. Distribuição da prevalência de esclerose múltipla em diferentes áreas do planeta.** (Extraído de Simpson *et al*, 2011)

Estimativas recentes apontam que aproximadamente 2.5 milhões de indivíduos são afetados em todo o mundo, o que reflete grande importância em saúde pública como sendo uma das principais doenças neurológicas existentes (Compston e Coles 2008). A média de prevalência é de 100 casos a cada 100.000 habitantes nas regiões com maior incidência. A doença também apresenta grande relevância no Brasil. A prevalência varia de 1,36 por 100.000 nas regiões equatoriais a 15 casos por 100.000 habitantes na região sudeste, (Ferreira, Machado *et al.* 2004; Fragoso e Fiore 2005).

Normalmente, as manifestações clínicas da doença aparecem na faixa de jovens adultos, em média 30 anos de idade, e as mulheres são mais afetadas, com aproximadamente 2 a 3 vezes mais prevalência do que nos homens (Kamm, Uitdehaag *et al.* 2014). Classicamente, a doença apresenta-se inicialmente como ataques severos que levam aos sinais neurológicos clínicos como danos visuais, espasmos musculares, déficits cognitivos, fadiga, paralisia de membros, entre outros, com comprometimento focal no nervo ótico, medula espinhal e parênquima cerebral (Frohman, Racke *et al.*



2006;Stys 2013). As manifestações clínicas são associadas com as áreas e a intensidade das lesões desmielinizantes ao longo do SNC. Este curso primário de relapso-remissão frequentemente evolui para um curso secundário progressivo 5 a 25 anos após os primeiros sinais da doença, o qual é caracterizado pela piora lenta e irreversível dos sinais clínicos, sendo aqueles episódios agudos substituídos pela apresentação crônica (Confavreux e Vukusic 2006;Kamm, Uitdehaag *et al.* 2014). Há também uma parcela menor dos indivíduos (aproximadamente 10%) afetados que desenvolve diretamente o estágio primário progressivo da doença, sem a remissão dos danos observada na maioria dos casos iniciais (Lublin e Reingold 1996). Um outro subgrupo de pacientes apresentam surtos com severidade reduzida e não evoluem para a curso secundário progressivo (Lublin e Reingold 1996). Além do mais, há também um pequeno grupo de pacientes que desenvolvem o modelo mais agressivo da doença, com sintomas extremamente severos e dentro de um espaço curto de tempo vêm a falecer (Ransohoff, Hafler *et al.* 2015). Como observado em todos os casos, as áreas do SNC afetadas, a frequência em que isso ocorre e conseqüentemente a apresentação clínica da neuropatologia é muito heterogênea entre os indivíduos, o que dificulta o tratamento.

Os episódios de relapso observados na EM correlacionam-se com “ondas” inflamatórias contendo grande número de células autorreativas infiltrando o SNC após a quebra da barreira hemato-encefálica (BHE). Além do mais, há o processo de desmielinização ativa como fator resultante de fatores inflamatórios presentes no tecido (Lucchinetti, Bruck *et al.* 2000). Esse processo está presente nos ataques agudos apresentados em pacientes com a doença. Por outro lado, quando o curso se torna

crônico, o infiltrado celular é reduzido, porém há extensa dano axonal irreversível e significativa perda de mielina.

Existem quatro aspectos principais durante o desenvolvimento da EM: 1) Inflamação, que apesar de seus mecanismos ainda não estarem totalmente conhecidos é apontada como principal processo envolvido no dano do SNC durante a doença; 2) desmielinização, onde a bainha de mielina é destruída devido ao processo inflamatório no local; 3) perda ou dano axonal, com a funcionalidade dos axônios sendo muito prejudicada e 4) gliose, a qual dá ao tecido a aparência de placas, também ocorrendo extensa perda no número de células importantes, como por exemplo micróglia e astrócitos (Barnett e Prineas 2004). A esclerose é uma doença que ainda não possui cura, e o tratamento é complexo devido a heterogeneidade apresentada entre os pacientes e a não predição do curso clínico que a doença apresentara em cada indivíduo. Agentes imunomodulatórios/imunossupressores têm sido usados como estratégia terapêutica há mais de 20 anos, com relativo sucesso, particularmente na diminuição dos prejuízos relacionados aos surtos da doença. Entre estes, podemos destacar o Interferon Beta (IFN- $\beta$ ) e o acetato de glatiramer, que são tratamentos de primeira linha. Para apresentações clínicas mais severas, há disponíveis estratégias de segunda linha, como aqueles com anticorpos monoclonais como o Natalizumab e ainda os que se utilizam de agentes citotóxicos, como a Mitoxantrona. Além destes, há outros tratamentos já sendo utilizados ou em fase de desenvolvimento (Kappos, Freedman *et al.* 2007; Rudick, Miller *et al.* 2007; Comi, Martinelli *et al.* 2009; De Stefano, Comi *et al.* 2014; Vidal-Jordana, Sastre-Garriga *et al.* 2015).

Apesar de avanços no estudo da EM, resultando em terapias como as exemplificadas acima, ainda há grande necessidade do maior entendimento da doença visando melhorar as estratégias terapêuticas já estabelecidas (por exemplo, diminuindo os efeitos colaterais e/ou aumentando a eficácia) e eventualmente desenvolver novas abordagens. Neste sentido, modelos animais têm sido de crucial importância para o estudo da EM.

## **1.2. Encefalomielite autoimune experimental (EAE)**

Muito do que se sabe até o momento sobre os mecanismos imunopatológicos que levam ao desenvolvimento da esclerose múltipla provém de estudos com modelos animais que mimetizam a doença humana. Entre os modelos animais desenvolvidos para tal, a EAE é o modelo mais aceito e utilizado para estudar os eventos desencadeadores da neuropatia. O modelo foi desenvolvido a partir de achados com humanos e estes foram os primeiros a serem sensibilizados com amostras de tecido nervoso, o que resultou em doença inflamatória no SNC. Essas observações foram feitas por Albert Sabin e Arthur Wright durante testes de vacinas antirrábicas produzidas a partir de coelhos. Foi demonstrado posteriormente que esta encefalomielite resultante ocorreu não pelo vírus propriamente, mas sim pela contaminação com material da medula espinhal dos coelhos. A partir de então, Thomas Rivers desenvolveu o modelo experimental para compreender melhor estes eventos e em 1933 descreveu o modelo de EAE. (Ransohoff, Hafler *et al.* 2015).

Existem diferentes modelos de indução da EAE, cada um sendo importante para o estudo de mecanismos durante o desenvolvimento da EM humana. Podemos destacar dois tipos clássicos de indução da doença: EAE ativa e passiva.

A EAE passiva é induzida pela transferência de células TCD4 específicas para mielina previamente ativadas em um animal doador para um animal receptor, o qual irá desenvolver a resposta autoimune. Este tipo de indução foi muito importante para estabelecer o papel de células específicas nos mecanismos envolvidos na patogênese da EAE (Constantinescu, Farooqi *et al.* 2011) Por outro lado, na EAE ativa, modelo o qual foi utilizado no presente estudo, a imunização é feita com peptídeos de mielina, como por exemplo MOG (*Myelin Oligodendrocyte Glicoprotein*: glicoproteína da mielina de oligodendrocitos), em uma emulsão com CFA (*Complete Freund's Adjuvant*: adjuvante completo de Freund), por exemplo, e outros componentes.

MOG está inserido na superfamília das imunoglobulinas e é conservado evolutivamente entre diferentes espécies (Pham-Dinh, Mattei *et al.* 1993). A proteína é exclusivamente expressa no SNC, especificamente na bainha de mielina e na superfície dos oligodendrócitos (Brunner, Lassmann *et al.* 1989). Na EAE, anticorpos contra MOG podem aumentar a desmielinização e o domínio extracelular da molécula é altamente encefalitogênico, com capacidade de induzir respostas humorais bem como mediadas por células (Mayer e Meinel 2012). Corroborando com isso, camundongos transgênicos possuindo células T com o receptor específico para MOG desenvolvem EAE de forma espontânea (Bettelli, Pagany *et al.* 2003).

É bem estabelecido que, após a imunização, o início dos sinais clínicos geralmente aparece entre 9 e 12 dias e são seguidos por variáveis consequências clínicas e

patológicas. Em seguida ao início da doença ocorre a fase de pico, entre 14 a 17 dias pós indução, a qual é geralmente seguida da fase tardia ou de remissão, com recuperação parcial dos danos provocados na fase aguda em animais do tipo selvagem (Rodrigues, Lacerda-Queiroz *et al.* 2011; Inoue, Williams *et al.* 2012).

### **1.3. Esclerose múltipla e EAE: similaridades e discrepâncias**

Há diversas similaridades entre o modelo experimental e a doença humana. Em primeiro lugar, a debilidade motora é evidente nos dois casos. Tanto humanos quanto animais apresentam um relevante quadro clínico de debilidade motora. A perda de peso e debilidade física é frequente em ambos eventos patológicos. Outro fator importante é o processo inflamatório desenvolvido no SNC. Além da presença de linfócitos T CD4+ em amostras de animais e de pacientes com EM – o papel destas células será abordado mais adiante – outras células também são importantes, como macrófagos, neutrófilos, entre outras (Constantinescu, Farooqi *et al.* 2011). Além do mais, há grande liberação de citocinas inflamatórias e outros fatores imunes relacionados à inflamação, como quimiocinas, moléculas de adesão, e outras (Constantinescu, Farooqi *et al.* 2011). A desmielinização é um processo atuante, com perda grave de mielina e também há dano axonal nos dois casos.

Importante correlação também é observada em alguns tratamentos. Exemplos disso são aqueles com os IFNs e o acetato de glatiramer. Apesar dos mecanismos de ação não serem completamente conhecidos, ambos tratamentos apresentam boa ambiguidade. Inclusive, o estabelecimento do acetato de glatiramer como medicamento contra a EM é intimamente relacionado ao seu ótimo desempenho em atenuar a EAE (Lim

e Constantinescu 2010) Estes e outros fatores símiles em ambos quadros patológicos valida a EAE como um modelo experimental para o estudo imunopatológico e subsequentemente se torna uma ferramenta muito importante para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para a doença humana.

Entretanto, como todo modelo experimental, há também disparidades entre as duas neuropatologias. Diferença importante entre EM e a EAE é que o modelo animal requer um passo de imunização externo para vir a se desenvolver, o que não ocorre na doença humana, ao menos de forma artificial. Na EAE, o antígeno indutor da resposta imunológica é conhecido previamente, porém na EM este não é conhecido. Também, a indução de EAE é feita em grupos de animais geneticamente idênticos, o que não pode ser observado nos pacientes. Além do mais, animais são mantidos sob certas condições ambientais controladas, como iluminação, alimentação, o que está relacionado, dentre alguns fatores, com a microbiota intestinal, que é importante também para a susceptibilidade à doença. Essas condições variam muito entre os humanos (Constantinescu, Farooqi *et al.* 2011).

No aspecto farmacológico, algumas drogas se mostraram eficazes na inibição da EAE, porém esse resultado não se mostrou bem-sucedido quando foi transpassado para os pacientes. Como exemplo, podemos destacar o uso de deoxispergualina, que é um xenobiótico com propriedades imunossupressoras e apresentou bons resultados em animais, porém quando foi utilizado em teste com pacientes, falhou em apresentar qualquer melhora nos indivíduos (Cross e Naismith 2014). Além do mais, certas abordagens tendo citocinas como mecanismo também produziram discrepâncias. Tratamentos que aumentam os níveis de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF-

$\beta$  (*Transforming Growth Factor beta*: fator de transformação do crescimento beta) foram eficazes em EAE, porém não reproduziram estes resultados em pacientes devido aos efeitos colaterais sérios. Por outro lado, o bloqueio de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor alpha*: fator de necrose tumoral alfa) não foi bem-sucedido nos pacientes com EM, apesar de ser observado sucesso em animais com EAE e também em outras doenças autoimunes humanas, como é o caso do Remicade® (droga anti-TNF) no tratamento para a artrite reumatóide e Doença de Chron (Constantinescu, Farooqi *et al.* 2011). Além do mais, o uso do IFN $\gamma$  como tratamento é um dos exemplos mais marcantes de discrepância. Enquanto o tratamento com esta citocina suprime a EAE, o seu bloqueio resulta em aumento da severidade nos animais (este processo será mais detalhado posteriormente). Já em humanos ocorre exatamente o inverso, onde a aplicação intravenosa da citocina resultou em indução de surtos em um grande número de indivíduos doentes e seu uso foi abolido (Lim e Constantinescu 2010).

Fator que dificulta o estabelecimento de parâmetros discrepantes é a publicação predominante de resultados positivos, ignorando os negativos, principalmente nos estudos mais antigos. Atualmente, esse pensamento tem mudado nos estudos relacionados a EM.

Neste trabalho nós assumimos a EAE como um modelo plausível para o estudo da esclerose múltipla, uma vez que os parâmetros investigados no presente trabalho são também de grande importância e ocorrem indubitavelmente na doença humana. O modelo que utilizamos neste estudo é aquele por indução por MOG<sub>35-55</sub> em animais com *background* C57/BL6, amplamente usado por laboratórios de todo o mundo.

## 1.4. Resposta imune e desenvolvimento da esclerose múltipla e EAE

### 1.4.1. Imunidade inata

Para o estabelecimento da EAE em um animal suscetível, primeiramente os linfócitos T que permaneceram após os mecanismos básicos de seleção tímica prévios são ativados em tecidos linfóides como o baço por células apresentadoras de antígeno (APCs: do inglês, *Antigen-Presenting Cells*) que carregam o antígeno de mielina em seus complexos de histocompatibilidade principal do tipo II (MHC II :*Major Histocompatibility Complex II*). Nesta fase, as células dendríticas são as principais APCs atuantes na apresentação do antígeno, porém macrófagos também têm papel relevante. Na esclerose múltipla, o mecanismo desencadeador da resposta inicial ainda não é estabelecido, mas muitos pesquisadores acreditam ser devido a infecção por patógeno ainda desconhecido (Constantinescu *et al*, 2011).

Tanto micróglia quanto astrócitos desempenham importantes papéis na fisiologia normal do tecido nervoso quanto na injúria. A micróglia é o principal componente da resposta imune inata no cérebro. Um perfil de resposta M1 está associado com liberação de citocinas pró-inflamatórias e produção de ROS. Por outro lado, o perfil microglial M2 produz fatores neurotróficos como BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*: Fator neurotrófico derivado do cérebro), por exemplo, citocinas anti-inflamatórias, entre outros (Heneka *et al*, 2014). Em sua superfície, a micróglia possui diversos receptores, como por exemplo receptores para neurotransmissores, hormônios, receptores de citocinas e quimiocinas e também receptores de reconhecimento padrão (do inglês *Pattern Recognition Receptors*: PRRs), como TLR(*Toll Like-Receptors*: receptores semelhantes ao Toll) 2, 4 e 6 (Rigato, Buckinx *et al*. 2011; Parkhurst, Yang *et al*. 2013).



Micróglia não ativada expressa baixos níveis de CD45, CD40, CD80, MHC I e II, entre outros. Porém, após estímulo inflamatório, essas células aumentam significativamente a expressão dessas moléculas, bem como a capacidade fagocítica e podem estimular a proliferação de linfócitos Th1 (Aloisi, Ria *et al.* 1998; Aloisi 2001) (Nimmerjahn, Kirchhoff *et al.* 2005). Importante, micróglia ativada também podem secretar quimiocinas que recrutam mais linfócitos para o SNC.

Em doenças degenerativas, como a doença de Alzheimer ou esclerose múltipla, células microgliais produzem elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  entre outras e pode fagocitar produtos provenientes dessas patologias, como por exemplo a proteína  $\beta$ -amiloide (Koenigsnecht-Talboo e Landreth 2005). Outro estudo demonstrou que no modelo de doença de Parkinson, a molécula  $\alpha$ -sinucleína pode ativar micróglia, o que resulta em progressão da doença (Zhang, Liu *et al.* 2014).

Astrócitos são as células mais abundantes no cérebro e desempenham diversas funções neste sítio, sendo a principal delas o suporte físico e fisiológico aos circuitos neuronais cerebrais e apresentam variações em sua morfologia e também, assim como micróglia, em sua densidade dependendo da localização no cérebro (Khakh e Sofroniew 2015). Além do mais, os astrócitos possuem papel na metabolização de glutamato, estabilização das concentrações de potássio no cérebro e na produção de outros fatores importantes para o funcionamento de outras células, como micróglia e neurônios (Chastain, Duncan *et al.* 2011; Kimelberg *et al.*, 2010).

Astrócitos expressam alguns receptores de reconhecimento padrão, como TLR2, 3 e 4 (Hamby, Coppola *et al.* 2012; Holm, Draeby *et al.* 2012; Zamanian, Xu *et al.* 2012)

e estes podem ser regulados por fatores inflamatórios como IFN- $\gamma$  (Holm, Draeby *et al.* 2012). Além do mais, estas células possuem receptores para várias citocinas, como IL-6, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , entre outras. (John, Lee *et al.* 2003; Cahoy, Emery *et al.* 2008; Hamby, Coppola *et al.* 2012). Não está esclarecido totalmente se astrócitos funcionam de forma eficiente na apresentação de antígenos para células T durante EM e EAE. Por outro lado, essas células secretam fatores de diferenciação/proliferação de diferentes subtipos de linfócitos T. Eles podem secretar IL-12, IL-4 e IL-23, IL-6, TGF- $\beta$ , os quais estão envolvidos na condução de resposta Th1, Th2 e Th17, respectivamente. Porém, não se sabe se isso é suficientemente crucial para gerar proliferação dessas células durante a patologia (Constantinescu, Farooqi *et al.* 2011). Além do mais, após estimulação com DNA bacteriano, essas células podem secretar quimiocinas como CCL-2 e 5 e CXCL-10 (Carpentier *et al.*, 2008). Durante EAE, já foi demonstrado que os astrócitos secretam CCL-2, influenciando o recrutamento de linfócitos para o SNC

APCs e células endoteliais possuem repertório limitado e fazem o reconhecimento antigênico através de PRRs (Takeuchi e Akira 2010). Isso pode ser devido a característica imediata da ação destas células. O estímulo de células via PRRs resulta em consequente ativação da resposta imune inata, mas também na subsequente indução de resposta adquirida (Inohara, Chamaillard *et al.* 2005).

#### **1.4.2. Receptores de reconhecimento padrão: inflamassomas**

Os antígenos microbianos são reconhecidos pelos PRRs através de estruturas denominadas padrões moleculares associados aos patógenos (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*: PAMPs), onde podemos citar ácidos nucleicos bacterianos ou

componentes da membrana celular destes organismos como exemplos destes PAMPs que são conservados entres estes microrganismos. Por outro lado, os sinais de dano provenientes do hospedeiro são denominados padrões moleculares associado ao perigo (*Danger-Associated Molecular Patterns*: DAMPs). Entre os exemplos desse grupo, podemos mencionar cristais de ácido úrico, ATP (*Adenosin Tri Phosphate*: Adenosina Trifosfato), proteína  $\beta$ -amiloide e cristais de colesterol (Chen e Nunez 2010; Szabo e Petrasek 2015).

De acordo com sua sub-localização celular, os PRRs podem ser agrupados em duas classes principais: os receptores transmembranares presentes em membranas de células ou nas de endossomos, como TLRs e CLR (C-Type Lectin Receptors: receptores de lectina do tipo C) e aqueles que são encontrados em compartimentos intracelulares, como os NLRs (*Nucleotide-Binding Oligomerization Domain-Like Receptors*: receptores semelhantes ao domínio de oligomerização da ligação a nucleotídeo) (Kanneganti, Lamkanfi *et al.* 2007;Doria, Zen *et al.*; 2012).

Os membros da família NLR possuem domínios estruturais conservados. Um domínio de repetição rico em leucina na face C-terminal (*Leucine-Rich-Repeat*: LRR); um domínio central de ligação a nucleotídeos (*Nucleotide-Binding-Domain*:NACHT) e uma região N-terminal que é variável, onde alguns membros possuem a região recrutadora de caspase-1 CARD (*Caspase-1 Activation and Recruitment*); o domínio BIR (*Baculovirus Inhibitor of apoptosis protein Repeat*) ou um domínio de pirina PYD (*PYrin Domain*). Os membros do subgrupo NAIP (*Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein*) possuem o domínio BIR; já aqueles do subgrupo NLRC (*NOD Like Receptor containing CARD 4*) contém o

domínio CARD; e as proteínas do terceiro subgrupo de NLR, os NLRPs, possuem o domínio PYD na sua região N-terminal (Tschopp e Schroder 2010).

Os inflamassomas são grandes complexos multiproteicos cuja formação se dá no compartimento citosólico de células imunes após os estímulos liberados pelo reconhecimento tanto de PAMPs quanto de DAMPs por receptores associados à família NLR. A formação dessas plataformas proteicas resulta em ativação de caspase-1 bem como na clivagem e consequente ativação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$  e IL-18 (Tschopp e Schroder 2010; Szabo e Petrasek 2015).

Geralmente, as proteínas que formam os inflamassomas estão expressas a níveis basais, porém sob o estímulo adequado há aumento da expressão dessas moléculas e a formação do complexo ocorre. Uma vez ativados, os NLRs oligomerizam-se através de seus domínios NATCH e recrutam a molécula adaptadora ASC (*Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD*: proteína semelhante a partícula associada à apoptose contendo um CARD). A interação do NLR com ASC se dá através do domínio PYD contido em ambas moléculas (de Alba 2009). Após essa interação, o complexo NLR/ASC recruta uma terceira molécula, a pró-caspase-1, e isso se dá através do domínio CARD contido na molécula de ASC e na pró-caspase (Lu, Magupalli *et al.* 2014). O agrupamento de pró-caspase-1 no complexo permite a autoclivagem de moléculas resultando em liberação de tetrâmeros p10/p20 de caspase-1 ativos, os quais estão aptos para processar proformas de IL-1 $\beta$  e IL-18, o que resulta em amplificação da inflamação.

### 1.4.3. O Inflamassoma NLRP3, esclerose múltipla e EAE

Entre os membros da família NLR, o inflamassoma NLRP3 (*Nucleotide-binding domain and Leucine-rich Repeat Protein 3*: proteína 3 contendo repetições ricas em leucina e um domínio de ligação a nucleotídeos) é um dos mais bem estudados. Enquanto outros tipos de inflamassoma reconhecem um número limitado de DAMPs ou PAMPs, o NLRP3 é estimulado por uma variedade maior de sinais de perigo, o que o torna o mais importante clinicamente. Dentre os estímulos microbianos que ativam o inflamassoma NLRP3, podemos citar RNA bacteriano, cristais de hemozoína derivados de *Plasmodium* *ssp*, por produtos virais, entre outros. Estímulos endógenos como ATP, sílica, proteína  $\beta$ -amiloide são alguns exemplos de ativadores do NLRP3 (Fitzgerald 2010; Rathinam, Vanaja *et al.* 2012).

O processo de ativação do inflamassoma NLRP3 é classicamente descrito como um processo em dois passos ou sinais, e provavelmente não está relacionado com contato direto do estimulador com o complexo. No primeiro, após o reconhecimento de ligantes cognatos por TLRs, receptor de IL-1 ou de TNF, há a translocação de NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor kappa B*: Fator nuclear kappa B) para o núcleo e ocorre expressão de *nlrp3*, *pro-il-1 $\beta$*  e *pro-il-18*. No segundo sinal, uma grande variedade de PAMPs e DAMPs pode induzir a oligomerização e ativação do NLRP3, com recrutamento e interação de ASC e pró-caspase-1 para resultar em autoclivagem da caspase e finalmente o processamento das citocinas (Kim e Jo 2013).

Em relação a esclerose múltipla, estudos já demonstraram o envolvimento do inflamassoma NLRP3 durante o desenvolvimento da doença. Em pacientes, as moléculas associadas com a atividade do inflamassoma, como NLRP3, IL-1 $\beta$ , IL-18, são

aumentadas. Por exemplo, há aumento de caspase-1 nas placas escleróticas e em células mononucleares (Ming, Li *et al.* 2002; Huang, Huang *et al.* 2004). Além do mais, IL-1 $\beta$  foi encontrada a níveis elevados no fluido cérebro-espinhal de indivíduos doentes e, em outro estudo, IL-18 apresentou expressão aumentada em células mononucleares. (Huang, Huang *et al.* 2004). Agonistas conhecidos do inflamassoma NLRP3 também são encontrados em nível elevado em amostras de pacientes com EM. Como exemplo, podemos citar o aumento de ácido úrico no líquido cérebro-espinhal e no soro dos indivíduos e aumento da atividade de catepsina B no cérebro (Bever, Panitch *et al.* 1994; Amorini, Petzold *et al.* 2009).

Relatos sobre o papel de NLRP3 na EAE são numerosos e trazem mais abordagens para a pesquisa da doença humana. Estudos com camundongos deficientes revelaram que a ausência de NLRP3, ASC, Caspase-1, IL-18 e IL-1 $\beta$  resulta em severidade significativamente reduzida da doença (Furlan, Martino *et al.* 1999; Jha, Srivastava *et al.* 2010; Inoue, Williams *et al.* 2012), indicando que a ativação do inflamassoma é crucial na apresentação clínica da doença de forma severa. Além do mais, IL18 e IL-1 $\beta$  são elevadas no soro e baço dos animais doentes (Gris, Ye *et al.* 2010). Foi demonstrado também que NLRP3 tem um papel crítico na migração de células T *helper* para o SNC durante EAE (Inoue, Williams *et al.* 2012).

#### **1.4.4. Importância de linfócitos T *helper* (Th)1 e Th17 no desenvolvimento da EAE**

Após ativação periférica, linfócitos passam a expressar marcadores de ativação que facilitam sua migração para o sítio nervoso. Eles entram então pelo SNC através de

sua migração regulada por moléculas de adesão (incluindo ICAMs integrinas, entre outras) e da quebra da BHE através da participação de enzimas proteolíticas (como metaloproteinases de matriz) (Aloisi, Ria *et al.*). No sistema nervoso, outras APCs (a esta altura podendo ser, por exemplo, células dendríticas infiltradas, macrófagos e monócitos infiltrantes ou residentes do SNC, como micróglia) reestimulam as células T, as quais participam do processo inflamatório local com a liberação de citocinas inflamatórias (IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6) e outros produtos (dos Santos, Barsante *et al.* 2005). A este ponto, o número de APCs MHC II+ capazes de apresentar o antígeno aos linfócitos T no SNC aumenta de forma significativa, pois há o recrutamento de monócitos circulantes que posteriormente se diferenciarão em células dendríticas ou macrófagos. Micróglia residente ativada libera fatores quimiotáticos, incluindo as quimiocinas CCL-2 e CCL-5, quimiocinas estas que são cruciais no recrutamento de linfócitos durante processos inflamatórios e possuem papel muito relevante na EAE (Fife, Huffnagle *et al.* 2000). Além do mais, produtos liberados, como IL-1 $\beta$ , aumentam a permeabilidade da BHE e, associado à liberação dos fatores quimiotáticos, induzem o recrutamento de mais células T, permitindo a entrada destas no SNC. Por sua vez, tais células podem ser específicas para epitopos distintos daqueles que foram reconhecidos pela população infiltrante inicial, processo conhecido como propagação de antígeno (*antigen spread*). O reconhecimento do antígeno e ativação destas células faz com que ocorra o perpetuamento do processo inflamatório no SNC, levando assim aos danos observados na fase aguda da doença (Tuohy, Yu *et al.* 1998).

Tanto na EAE quanto na EM células Th1 produtoras de IFN- $\gamma$  e Th17 produtoras de IL-17 são acreditadas serem as principais células efetoras durante o desenvolvimento do

processo inflamatório no sistema nervoso. Isso é demonstrado em estudos com camundongos deficientes de ROR- $\gamma$ t (*Orphan Nuclear Receptor  $\gamma$ t*: receptor nuclear órfão  $\gamma$ t) e T-bet, fatores de transcrição essenciais para diferenciação de Th17 e Th1, respectivamente. Estes animais são resistentes ao desenvolvimento de EAE após imunização e, também, estes fenótipos celulares são presentes no SNC de animais possuindo a neuropatologia (*Ivanov, McKenzie et al. 2006*). Além do mais, é encontrado grande infiltrado desses tipos celulares em tecidos de pacientes com EM. Inicialmente, linfócitos Th1 produzindo IFN- $\gamma$  foram apontados como as únicas células-chave para EAE, uma vez que a transferência adotiva de clones de células T CD4+ produtoras de IFN- $\gamma$  específicas para mielina gera EAE nos animais receptores. Em concordância com essas informações em animais, a indicação de que a doença humana também seria mediada por células Th1 foi suportada em trabalhos demonstrando que IL-12, citocina que estimula o crescimento de clones Th1, bem como o IFN- $\gamma$ , são altamente produzidos em lesões de pacientes com EM. De fato, IFN- $\gamma$  desempenha papel importante no processo inflamatório no SNC, como a ativação de células residentes, indução de MHC II, e também a produção de quimiocinas. No entanto, surpreendentes estudos posteriormente trouxeram à luz novas interfaces e expuseram um paradigma em relação aos linfócitos Th1 na EAE. Nesses estudos, camundongos *Ifng*<sup>-/-</sup> e *Ifngr*<sup>-/-</sup> são altamente suscetíveis a EAE (*Ferber et al, 1996*) o que não provia coerência com os estudos previamente descritos. Este impasse começou a ser solucionado com estudos sobre IL-12. Esta citocina é composta por duas subunidades: a p35 e a p40. Camundongos IL-12p35<sup>-/-</sup> são susceptíveis a indução de EAE, porém animais IL-12p40<sup>-/-</sup> são altamente resistentes à mesma, abrindo margem para novas descobertas. Estudos subsequentes revelaram que a subunidade



p40 da IL-12 é compartilhada com a subunidade p19 de uma outra citocina, a agora descrita IL-23. Trabalhos complementares utilizando animais IL-12/IL-23p19<sup>-/-</sup>, IL-23p19<sup>-/-</sup> definitivamente estabeleceram o papel da então nova citocina na doença. Estes dados indicam que o perfil Th1 é suficientemente importante para o estabelecimento de EAE, mas não é o único fenótipo efetor envolvido neste processo. A descoberta de que IL-23 é importante para a diferenciação de um novo subtipo de linfócito T CD4, desconhecido até então, foi reveladora. Em atuação mútua com outras citocinas, como TGF- $\beta$  e IL-6, IL-23 induz a diferenciação de células fenotipicamente T CD4 produtoras de IL-17, as quais possuem característica altamente pró-inflamatória. A hipótese de que essas células seriam componentes importantes para o estabelecimento de EAE (assim como para EM) foi confirmada nos estudos que se seguiram durante os anos posteriores. Animais com deficiência de IL-23, bem como IL-17 e seus receptores, apresentam incidência e severidade da doença diminuídas, além dos sinais sendo apresentados em um tempo mais tardio, em comparação aos animais do tipo selvagem (Langrish *et al*, 2005). Além do mais, IL-17 e também células produtoras desta citocina são detectadas em tecidos de pacientes com EM.

No entanto, ainda não é claro qual o fenótipo é o mais crítico para a severidade da doença animal. A razão Th1: Th17 pode variar conforme a linhagem animal e a estratégia de imunização. Por exemplo, animais C57BL/6 apresentam predominância do fenótipo Th1 no pico da doença, aproximadamente 14 dias após a indução, enquanto a linhagem SJL demonstra maior predominância de Th17 nesta fase da doença. Distintos epitopos de MOG utilizados para realizar a imunização podem induzir respostas de células T com diferentes razões entre esses dois fenótipos de T *helper* (Stromnes, Cerretti *et al*. 2008).

Ainda há muito debate sobre qual subtipo específico de célula T *helper* seria o mais crítico para o estabelecimento da inflamação no SNC durante a EAE. Langrish *et al* demonstraram que EAE induzida em camundongos SJL por transferência de linfócitos Th17 resultou em maior severidade quando comparada com a induzida por Th1 (Langrish, Chen *et al.* 2005). Entretanto, em outro estudo utilizando um protocolo similar o resultado não demonstrou diferença para a imunização dos animais com ambos os fenótipos (Kroenke, Carlson *et al.* 2008). O motivo para tais discrepâncias ainda não está esclarecido, podendo ser desde diferenças nos protocolos a até mesmo a contaminação de células Th1 nos experimentos com Th17, uma vez que nesses estudos não foram usadas células Th17 totalmente puras. Além do mais, sabe-se que o fenótipo Th17 apresenta um nível de plasticidade que pode influenciar na severidade da doença. Por exemplo, células Th17 polarizadas com TGF- $\beta$  e IL-6 induzem tanto EAE quanto colite de uma forma significativamente mais severa, apresentando um fenótipo patogênico similar àqueles polarizados sob tratamento com IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-23. Em contrapartida, os linfócitos Th17 polarizados através da incubação *in vitro* com TGF- $\beta$  mais IL-6 desenvolvem um perfil não patogênico, resultando em EAE apresentada de forma menos severa (Lee, Awasthi *et al.* 2012).

#### **1.4.5. Mecanismos de regulação/resolução**

Após a fase inicial de estabelecimento do processo inflamatório, o que resulta no mecanismo agudo de inflamação e dano do SNC, animais do tipo selvagem apresentam produção de resposta reguladora/resolutiva frente aos eventos iniciais, e células T reguladoras são de crucial importância nessa segunda fase da EAE, a fase de

recuperação ou remissão. Mecanismos de regulação/resolução são importantes no sentido de envolvimento na progressão da doença. O balanço entre células Th1/Th17 e T reguladoras (Treg) FoxP3+ (*Forkhead Box P3+*) é importante para o resultado de severidade da doença. Experimentos de transferência adotiva e depleção revelaram que células Treg podem controlar o desenvolvimento bem como a severidade de EAE (Lafaille, Nagashima *et al.* 1994; Olivares-Villagomez, Wang *et al.* 1998). A transferência de células Treg CD4+CD25+ para animais doentes reduziu os sinais da doença e esse subtipo celular foi capaz de suprimir a resposta de células T específicas para MOG em experimentos *in vitro*. O efeito protetor desse subtipo celular pode ser mediado por IL-10, uma citocina de caráter anti-inflamatório, uma vez que a deficiência desta molécula resultou em falha na proteção. No entanto, respostas reguladoras suprimindo a atividade de linfócitos Th17 MOG-específicos, resultando em perfil protetor para EAE foram associadas com mecanismo dependente de TGF- $\beta$  (Walsh, Brady *et al.* 2009). Em contrapartida, Korn *et al* demonstraram que, embora presentes no SNC durante a fase de pico inflamatório da EAE, as células Treg não foram capazes de impor seu fenótipo supressor às células T efetoras, sendo isto atribuído ao perfil altamente inflamatório destas últimas, conferindo resistência (Korn, Reddy *et al.* 2007).

Neste contexto, moléculas com perfil regulatório/resolutivo possuem papel importante em diversas doenças inflamatórias, como EAE, onde esse balanço entre perfil inflamatório e resolutivo são críticos. Especificamente nessas patologias, este balanço é fino e uma desregulação tendendo para um dos lados resultará em severidade ou resistência maior ao processo inflamatório resultante. Citocinas desempenham um papel importante nesses eventos, onde níveis de citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$ , IL-17,

TNF- $\alpha$ , IL-6 e as com perfil regulatório como IL-10, TGF- $\beta$  entre outras, podem estar intimamente relacionados com o fenótipo apresentado da doença.

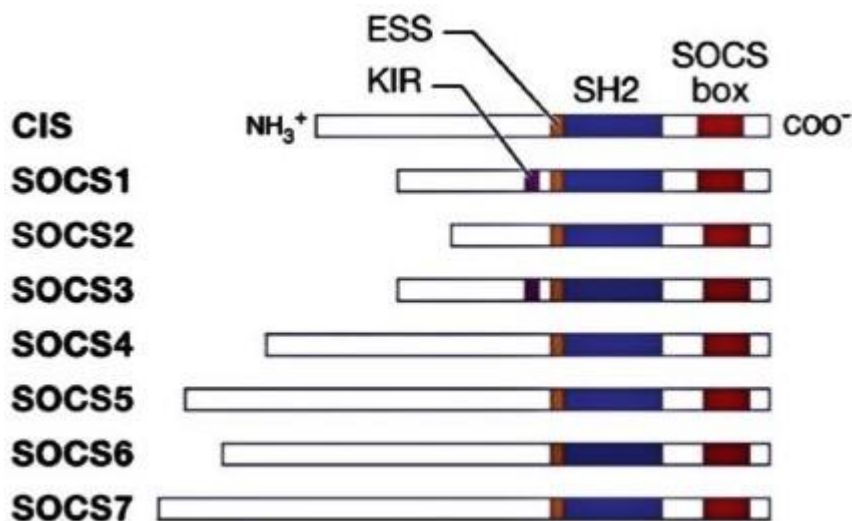
A atividade de diversas citocinas possui papel central durante todo o desenvolvimento da doença. A função das citocinas é mediada pela sinalização via seu receptor. A ligação de citocinas ao seu receptor induz a dimerização do mesmo e ativação de proteínas quinase Janus (*Janus Protein Kinases: JAKs*), as quais são associadas com a cascata de sinalização do receptor de citocina. Uma vez ativadas, as JAKs fosforilam-se entre si e os resíduos de tirosina fosforilados atuam como moléculas *docking* para os fatores de transcrição da cascata de sinalização subsequente, como membros da família dos ativadores de transcrição e transdução de sinal (*Signal Transduction and Activators of Transcription: STAT*). Dímeros de STATs ativados então translocam-se para o núcleo e podem iniciar a transcrição de diversos genes alvo (Inagaki-Ohara, Kondo *et al.* 2013).

### **1.5. Família de proteínas supressoras da sinalização de citocinas (*Suppressors of Cytokine Signaling: SOCS*)**

Proteínas da família SOCS são localizadas intracelularmente e atuam, entre outros processos biológicos, regulando a resposta de diferentes subtipos de células imunes frente a atuação de citocinas. Em células não estimuladas há expressão constitutiva dessas proteínas. Entretanto, sob estímulo, ocorre a indução das mesmas de forma rápida. São descritas algumas vias possíveis às quais essas proteínas regulam a sinalização de citocinas, entre as quais podemos destacar: bloqueio do recrutamento de STATs através de sua ligação ao receptor de citocina, impedindo a interação entre o mesmo e a STAT; degradação proteossomal de proteínas-alvo via ubiquitinação; ligação

à JAKs e inativação direta de suas quinases (Inagaki-Ohara, Kondo *et al.* 2013). Além das vias relacionadas a citocinas, proteínas da família também podem atuar em processos que não são associados com as mesmas, como no metabolismo, ciclo celular, câncer, entre outros (Rico-Batista *et al.*, 2006).

Até o momento, foram descritos oito membros da família SOCS (SOCS 1-7 mais a proteína com domínio SH2 induzível por citocina [*Cytokine-Inducible SRC Homology 2 (SH2) -Domain] CIS*), cada um contendo um domínio SH2 central, um domínio amino-terminal e um domínio carboxi-terminal o qual é conhecido como SOCS box, que funciona como ubiquitina ligase e regula a degradação de proteínas (Yoshimura, Naka *et al.* 2007) (Figura 2).



**Figura 2. Estrutura das proteínas SOCS.** Todas as proteínas da família possuem um domínio central SH2, um domínio de extensão ao domínio SH2(ESS) e um domínio C-terminal contendo o SOCS box. SOCS1 e 3 possuem uma região inibitória de quinases (KIR). Extraído de Palmer e Restifo, 2009.

O domínio central SH2 é o mais conservado entre todos os componentes dessa família, sendo ele quem determina a especificidade de ligação ao ligante cognato, como

por exemplo regiões fosforiladas de JAKs ou o reconhecimento de receptores de citocinas, com isso especificando a proteína-alvo a ser submetida à função reguladora daquela molécula de SOCS (Yoshimura, Naka *et al.* 2007) . Flanqueando esse domínio, na região N-terminal, existe uma região variável de extensão do domínio SH2 (ESS), a qual contribui para a interação com o substrato. Os membros SOCS1 e 3 possuem um domínio adicional na face N-terminal, chamado de região inibitória de quinases (KIR). Esta região atua como um pseudo-substrato que irá deslocar o *loop* de ativação na fenda catalítica das JAKs, inibindo assim a interação da quinase com seu respectivo ligante. Além do domínio KIR, nenhum outro motivo funcional foi descrito para a região N-terminal das proteínas SOCS. Entretanto, essa região é importante para a estabilidade da proteína e sua associação com a porção C-terminal auxilia no estabelecimento da interface entre SH2 e o SOCS box (Yoshimura, Naka *et al.* 2007). O domínio SOCS box compreende cerca de 40 aminoácidos e está localizado na região C-terminal da proteína. Ele interage com moléculas como as Elonginas B ou C e Culina 5, posteriormente recrutando a ubiquitina-transferase E3. Este complexo proteico irá conduzir proteínas-alvo para a degradação proteossomal através de ubiquitinação (Yoshimura, Naka *et al.* 2007)

### **1.5.1. A proteína SOCS2**

Entre as proteínas da família, SOCS2 é um dos integrantes menos estudados. Se fizermos uma busca em banco de dados, há relativamente poucos estudos sobre a proteína, quando comparamos com outros membros da família, como SOCS1 e 3. Nosso grupo vem desenvolvendo estudos relacionados a proteína em diversos modelos, como infecções parasitárias, obesidade, autoimunidade, e outros exemplos.

SOCS2 pode ser induzido através de estímulos como citocinas e hormônios, sendo expressa em diversos tipos celulares, como macrófagos, células dendríticas, linfócitos, células adiposas, células neuronais, entre outras. Conseqüentemente, está presente em diversos sistemas biológicos, como no fígado, pâncreas, tecido adiposo e SNC e tem envolvimento em diversos processos fisiológicos, como crescimento, desenvolvimento ósseo e neuronal, bem como eventos patológicos como câncer, infecções parasitárias e doenças metabólicas (Rico-Bautista, Flores-Morales *et al.* 2006). SOCS2 tem sido associado com a regulação do hormônio do crescimento (GH: *Growth Hormone*), uma vez que camundongos SOCS2<sup>-/-</sup> apresentam um crescimento corporal maior que os animais tipo selvagem (Metcalf, Greenhalgh *et al.* 2000). Estudos indicam que há quatro elementos responsivos dentro da região promotora de *socs2* que resultam em aumento da transcrição após tratamento com dioxina. Além do mais, ao que tudo indica, STAT5b pode se ligar ao promotor de *socs2* e iniciar sua transcrição. Estudo com camundongos STAT5b<sup>-/-</sup> demonstraram que a expressão de SOCS2 é deficiente após estímulo com GH (Davey, McLachlan *et al.* 1999; Woelfle e Rotwein 2004). Corroborando esses estudos, Vidal *et al* relataram que existem sítios de ligação para STAT5 na região proximal do promotor de SOCS2 (Vidal, Merino *et al.* 2007).

Outra questão importante sobre SOCS2 é sua capacidade de regular outros membros da própria família. Por exemplo, a sinalização de IL-2 e IL-3 é negativamente regulada por SOCS3. Entretanto, Tannahil *et al* demonstraram que SOCS2 pode induzir a degradação proteasomal de SOCS3 após o estímulo com estas citocinas, agindo como um antagonista da atividade de SOCS3 (Tannahill, Elliott *et al.* 2005). Em outro estudo, foi descrito que o efeito inibitório de SOCS1, mas não de SOCS3, na sinalização do GH foi

bloqueado pela alta concentração de SOCS2 após sua co-transfecção (Favre, Benhamou *et al.* 1999).

SOCS2 é expresso em células T e estudos recentes têm colocado a proteína no espectro da regulação de fenótipos de células T. A proteína atua na inibição do comprometimento para fenótipo Th2 por meio da inibição de STAT3 (Knosp, Carroll *et al.* 2011). Esse evento pode auxiliar a preferência para outros fenótipos, como Th1, por exemplo após estímulo. Por outro lado, SOCS2 possui relevante papel na função de células Tregs. A proteína é expressa nesse subtipo celular e recentemente foi demonstrado que SOCS2 desempenha papel crucial na estabilidade dessas células através da manutenção da expressão de FoxP3 (Sugimoto, Oida *et al.* 2006; Hill, Feuerer *et al.* 2007; Knosp, Schiering *et al.* 2013). Em um estudo, Knosp e colaboradores demonstraram que na ausência de SOCS2, a função de Tregs é comprometida devido a deficiência de FoxP3, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Knosp, Schiering *et al.* 2013).

### **1.5.2. A expressão de SOCS2 e a via 5-Lipoxigenase (5-LO) / Receptor Aril Hidrocarbono (AhR)**

A ativação do gene de SOCS2 pode ser mediada pelo receptor de aril hidrocarbono (*Aryl Hydrocarbon Receptor* – AhR). A expressão induzida de SOCS2 mediada por AhR promove a ubiquitinação e degradação de proteínas-alvo através do Fator 6 associado ao receptor de TNF (*TNF Receptor-Associated Factor-6* – TRAF6) (Machado e Aliberti, 2006). AhR é um receptor ativado por ligante que apresenta relevante promiscuidade, uma vez que pode ser ativado por uma série de ligantes naturais e sintéticos. Este receptor é localizado no citosol complexado com a proteína chaperona de choque térmico



90 (*heat-shock protein 90* – hsp90) e proteína quinase c-SRC (Soshilov e Denison 2011). Quando da ligação ao ligante, AhR sofre modificação conformacional, expondo um sítio de translocação nuclear, o que resulta em sua dissociação do complexo e subsequente translocação para o núcleo (Esser, Rannug *et al.* 2009). Uma vez no núcleo, AhR liga-se ao translocador nuclear do receptor aril hidrocarbono (*Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator* – ARNT) e o complexo AhR/ARNT inicia então a transcrição de genes-alvo os quais possuem região promotora contendo sequência consenso do elemento responsivo à dioxina (*Dioxin-Responsive Element*- DRE).

Produtos do metabolismo do ácido araquidônico via enzima 5 Lipoxigenase (5LO) são importantes ligantes para AhR. Em células dendríticas, por exemplo, AhR modula tanto a resposta imune inata quanto adquirida via ativação por Lipoxina A4 (LXA4) (Machado, Johndrow *et al.* 2006). Metabólitos de Leucotrieno A4(LTA4) também são envolvidos na modulação da atividade de AhR (Chiaro, Morales *et al.* 2008). Esses dados sugerem uma interação entre a via 5-LO e a ativação de AhR na modulação de respostas imunes inflamatórias. 5-LO é expressa principalmente em leucócitos e está envolvida na liberação de mediadores inflamatórios como leucotrienos. Outros produtos da via 5-LO, como 5(S) -*HydroPEroxy-6-Trans-8,11,14-cis-Eicosatetraenoic acid* (5-HPETE), que é o produto catalítico do metabolismo de leucotrienos, pode ser posteriormente metabolizado à lipídios da família das lipoxinas (Radmark, Werz *et al.* 2007).

Diante dos mecanismos supracitados, hipotetizamos que SOCS2 possa ter papel regulador em parâmetros inflamatórios e/ou resolutivos envolvidos durante o desenvolvimento da EAE, como a atividade de linfócitos T, produção de citocinas e quimiocinas, entre outros. Além do mais, em relação ao inflamassoma NLRP3,

hipotetizamos que a atividade desse complexo molecular especificamente em células do SNC pode influenciar o nível de severidade da EAE, atuando como uma forma de amplificação do processo inflamatório local estabelecido durante os mecanismos imunopatogênicos atuantes na doença.

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo estudar o envolvimento da proteína SOCS2 durante a encefalomielite autoimune experimental e definir o papel do inflamassoma NLRP3 em células de glia durante a doença

### 2.2. Objetivos específicos

- ✓ Analisar a expressão de SOCS2, 5-LO e AhR após indução de EAE
- ✓ Caracterizar clínica e histologicamente a doença nos animais SOCS2<sup>-/-</sup>
- ✓ Avaliar o perfil da resposta imunológica nos animais deficientes de SOCS2
- ✓ Analisar o infiltrado de subtipos de células T no SNC cruciais para o desenvolvimento da doença nos animais
- ✓ Verificar se NLRP3 especificamente no SNC dos animais é importante para o desenvolvimento de EAE
- ✓ Avaliar a ativação de NLRP3 por estimulação de ATP em culturas de micróglia e astrócitos
- ✓ Examinar a capacidade ou não de células de órgãos linfóides periféricos de camundongos induzidos por EAE em ativar o inflamassoma NLRP3 em células de glia *in vitro*
- ✓ Avaliar qual subtipo de linfócito T é capaz de induzir produção de IL-1 $\beta$  por micróglia ou astrócitos na presença de MOG

### **3. Material e métodos**

#### **3.1. Animais**

Foram utilizadas fêmeas de camundongos C57BL/6, AhR<sup>-/-</sup> e SOCS2<sup>-/-</sup> com idade entre 8 a 12 semanas. Os camundongos C57BL/6 foram obtidos no Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO-ICB-UFMG) e os animais SOCS2<sup>-/-</sup> e AhR<sup>-/-</sup> foram mantidos em biotério de criação próprio (ICB-UFMG). Os camundongos foram mantidos sob condições estritas de ética de acordo com as recomendações internacionais de bem-estar do animal (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1996). Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG, sob o número de protocolo 152/2012.

Para a parte experimental no estudo de NLRP3, foram utilizados camundongos machos C57BL/6, NLRP3<sup>-/-</sup> e 2D2 TCR Tg com idade entre 8 a 12 semanas, os quais foram obtidos e mantidos nas instalações do *Duke University Medical Center*. Os camundongos foram mantidos sob condições estritas de ética de acordo com as recomendações internacionais de bem-estar do animal. O uso de animais para experimentação foi aprovado pelo *Duke University Institutional Animal Care and Use Committee*.

#### **3.2. Indução e avaliação diária de EAE**

EAE foi induzida através de emulsão contendo MOG<sub>35-55</sub> (*myelin oligodendrocyte glycoprotein*- Sigma Aldrich M4939), adjuvante completo de Freund (*Complete Freund's Adjuvant*- Sigma Aldrich F5881) e 4 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* H37 RA (Difco Laboratories, Sparks, MD, USA). Cada animal recebeu 100µl dessa emulsão subcutaneamente. Além do mais, 300 ng/animal de toxina Pertussis (Sigma Chemical

Co,St. Louis,MO, USA) foram injetadas no dia da imunização e novamente 48 horas após. Os animais foram avaliados diariamente usando escore que varia de 0 a 4,5 conforme os sinais clínicos da doença: 0- nenhum sinal clínico; 0,5- paralisia parcial da cauda; 1- paralisia da cauda ou andar deficiente; 1,5- paralisia parcial da cauda e andar deficiente; 2- paralisia da cauda e andar deficiente; 2,5- paralisia parcial de pata traseira; 3- paralisia de uma pata traseira; 3,5- paralisia de uma pata traseira e parcial de outra; 4- paralisia completa de patas traseiras; 4,5- paralisia completa de patas traseiras e fraqueza de pata (s) frontal (is). Os animais também foram pesados nos dias 0, 3, 7 e após isso, diariamente. Um outro escore foi utilizado para experimentos realizados na *Duke University*. Os animais foram avaliados diariamente usando escore que varia de 0 a 5 conforme os sinais clínicos da doença: 0- nenhum sinal clínico; 0,5- paralisia parcial da cauda; 1- paralisia da cauda; 1,5- reflexo postural de endireitamento prejudicado mas reversível; 2 reflexo postural de endireitamento irreversivelmente prejudicado; 2,5- paralisia de uma pata traseira; 3- paralisia de ambas patas traseiras; 3,5- paralisia de ambas patas traseiras e de uma pata dianteira; 4- paralisia completa de patas; 5- morte

### **3.3. ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*)**

O cérebro, medula espinhal, timo e baço foram extraídos de animais controle e imunizados que foram sacrificados na fase de pico (14 dpi) e tardia (28 dpi) e imediatamente estocados no -80°C. Posteriormente, as amostras foram pesadas (padronizando a quantidade de 100 mg de amostra) e colocadas em 1mL de solução inibidora de proteases para extração de citocinas (NaCl 0,4M; Tween 20 0,05%; Albumina sérica bovina (BSA) 0,5%; Fluoreto de fenilmetilsufonila (PMSF) 0,1mM; cloreto de benzetônio 0,1mM; EDTA 10mM; 20UI de aprotinina), preparada a partir de uma solução

de tampão fosfato salina (PBS 1x). As amostras foram maceradas por um homogeneizador de tecidos (Power Gen 125, Fisher Scientific Pennsylvania, EUA) e a solução resultante foi centrifugada (Jouan, BR4i) a 7.800xg durante 10 minutos. O sobrenadante do homogenato foi recolhido, aliquoteado e estocado em congelador a -80°C até a sua utilização para detecção da concentração das citocinas. Para análise apenas do sobrenadante de culturas, o mesmo foi apenas recolhido e estocado imediatamente a -80°C até sua utilização.

Os sobrenadantes das amostras foram submetidos à metodologia de ELISA para a dosagem de diferentes citocinas e quimiocinas de acordo com cada experimento. Os *kits* para a dosagem de citocinas murinas foram obtidos da R&D Systems (DuoSet). Todos os ensaios foram realizados em placas de 96 poços (C96 MicroWell™ Plates, Nunc, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

O ensaio foi feito de acordo com os procedimentos previamente descritos pelo fabricante. Resumidamente, adicionou-se o anticorpo de captura específico, que foi incubado por 18 horas a 4°C. Após esse tempo as placas foram lavadas com PBS 1x contendo 0,1% de Tween por 3 vezes e bloqueadas por 2 horas com PBS 1x contendo BSA a 1%. As amostras diluídas e os padrões para cada citocina foram adicionados às placas a partir de concentrações decrescentes para estabelecimento da curva padrão de diluição recomendada pelo *kit* em uso. As placas foram incubadas por mais 18 horas a 4°C. O anticorpo de detecção foi adicionado em cada placa e incubado por 1 hora. A placa foi novamente lavada e uma solução contendo estreptavidina ligada à peroxidase (Pharmingen) foi adicionada. Após 30 minutos, as placas foram novamente lavadas e então adicionado tampão contendo o-fenilenodiamina (OPD, Sigma) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck). O

produto de oxidação do OPD foi detectado por colorimetria em um leitor de placas de ELISA (Molecular Devices, USA) na absorvância de 450nm.

### **3.4. Histologia**

Para avaliar as alterações estruturais e patológicas durante a doença, estudos histopatológicos do tecido cerebral e medular foram realizados. Os camundongos foram sacrificados no 14<sup>o</sup> e 28<sup>o</sup> dpi, por doses excessivas de anestésico (xilazina, Rompun<sup>®</sup> - Bayer e quetamina, Laboratório Cristália, SP). Durante a necropsia, os tecidos foram coletados e fixados por imersão em solução de formol tamponado a 10%. Após o período de fixação (no mínimo 12 horas), os tecidos foram recortados, utilizando uma navalha, e seccionados transversalmente. A cada animal foi dado um código que apenas foi revelado ao final de todas as análises.

Os tecidos foram, em seguida, submetidos à desidratação, com a finalidade de remover a água presente nos mesmos. O processo de desidratação foi realizado em concentrações crescentes de álcool (70%, 80%, 90% e absoluto I, II e III), sendo que os fragmentos permaneceram imersos por um período de 30 minutos em cada álcool. Após a etapa de desidratação, foi realizado o processo de diafanização, que tem como objetivo tornar o tecido translúcido. A diafanização consistiu em submeter os fragmentos a dois banhos de xilol (98,5%) com duração de 20 minutos cada. Posteriormente, os tecidos foram impregnados e incluídos em parafina.

Os blocos de parafina contendo o fragmento do órgão foram seccionados utilizando um micrótomo (American Optical, microtome 028 rotary), sendo obtidos cortes seriados com 4µm de espessura. Os cortes obtidos foram corados pela técnica de hematoxilina-

eosina (HE). As lâminas obtidas foram avaliadas ao microscópico óptico (aumento de 200x) (Olympus, Bx43), para estudos histológicos.

### **3.5. Citometria de fluxo**

Após sacrifício nos pontos indicados em cada experimento, o cérebro, medula espinhal e baço foram removidos dos camundongos e os leucócitos foram isolados por homogeneização em meio RPMI. Essa suspensão celular foi fracionada através de gradientes contendo 30 e 70% de percoll (Sigma, St. Louis, MO) diluídos em RPMI. Após centrifugação (8000xg), mielina foi retirada do topo da camada de 30% de percoll e descartada. Os leucócitos foram removidos da interface entre as camadas de 30 e 70% de percoll. Em seguida, os leucócitos foram centrifugados (600xg) e ressuspensos em 1 mL de uma solução contendo 0,5% de albumina sérica bovina (BSA), 2mM de azida e tampão salina fosfato (Ph 7.4). Leucócitos obtidos dos tecidos foram então marcados com uma combinação de: CD3(Pecy5), CD4(FITC), IFN- $\gamma$ (APC); CD4(FITC), CD25 Biotin/STP(PeCy7), FoxP3(PE); e CD3(Pecy5), CD4(FITC), IL-17A(APC). Os dados foram adquiridos utilizando-se FACSCanto II (Becton Dickinson, San José, CA, USA) e os dados coletados na citometria de fluxo foram então analisados através do *software* FlowJo (Tree Star, Ashland, Oregon, USA).

### **3.6. Western blotting**

Extratos celulares totais foram obtidos do cérebro homogeneizado de camundongos controle e imunizados ou de culturas celulares utilizando tampão de lise (1% Triton X 100, 100mM Tris/HCl, pH 8.0, 10% glicerol, 5mM EDTA, 200mM NaCl, 1mM DTT, 1mM PMSF, 25mM NaF, 2.5mg/mL leupeptina, 5 mg/mL aprotinina, e 1mM orthovanadato de sódio). Os lisados foram centrifugados a 13000 xg por 10 minutos a 4°C e



quantificados através de Bradford (Bio-Rad. Hercules, CA). Os sobrenadantes das culturas foram recolhidos e estocados imediatamente a -80°C até a utilização. Extratos proteicos (80 µg) foram separados por eletroforese em um gel desnaturante com 12% de poliacrilamida-SDS e transferidos para membranas de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas *overnight* com solução de PBS contendo 5% de leite e 0,1% de Tween 20, lavadas três vezes com PBS contendo 0,1% de Tween 20 e incubadas com os correspondentes anticorpos de cada experimento. Após incubação com os devidos anticorpos primários e secundários, as membranas foram submetidas a mais um passo de lavagem e as bandas foram visualizadas através de sistema de detecção queluminescente, como descrito pelo fabricante.

### **3.7. Cultura de células BMDM (*Bone Marrow-Derived Macrophage: macrófagos derivados da medula óssea*)**

Camundongos foram eutanasiados e os fêmures retirados e mantidos em PBS 1x com 2% SFB no gelo. Partículas de tecido muscular foram removidas. As extremidades do fêmur foram cortadas com uma tesoura previamente esterilizada e a medula óssea foi transferida para um *cellstrainer* a 70µm através de punção utilizado uma seringa de 10 ml com agulha 27G contendo PBS 1x com 2% de SBF e filtrada para uma placa de petri. Após homogeneização na placa de petri, a suspensão celular foi retirada, coletada para um tudo de 15mL e centrifugada a 1.400 rpm, a 4°C por 5 minutos. O *pellet* foi ressuspenso em meio RPI completo contendo 10% de SFB e cultivados em placas de petri com sobrenadante de cultura de células L929 e estufa a 37°C em uma atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> por 7 dias, substituindo metade do meio por meio novo a cada 3 dias.

### 3.8. Cultura primaria de glia e isolamento de micróglia e astrócitos

Camundongos neonatos da linhagem C57BL/6 de até 3 dias de nascimento foram utilizados para extração de células da glia conforme protocolo desenvolvido por Chen *et al* 2013. Resumidamente, neonatos foram eutanasiados por decapitação. Após isso, o cérebro foi removido e picotado em pequenos pedaços em tripsina/EDTA (0.005%). A suspensão foi transferida para um tubo de 15 ml e mantida em incubação a 37°C em uma atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> por 10 minutos para desagregação enzimática. Após esse período, DMEM com 10% de SFB foi adicionado na proporção de 1:1 para neutralizar a tripsina. A suspensão foi homogeneizada e então transferida para um tubo de 50 ml através de filtragem por um *cell strainer* de 70µm. A suspensão então foi centrifugada a 4°C, 2.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante descartado e o *pellet* ressuspensionado em 10mL/garrafa DMEM completo e transferido para as garrafas previamente revestidas com Poli-L-Lisina (Sigma) e mantida em estufa a 37°C em uma atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>. Após 3 dias, o meio foi substituído por meio novo e a partir de então, o mesmo foi trocado em sua metade em dias alternados. 13 dias após o início da cultura o meio foi completamente substituído por DMEM a 5% de SFB e no dia seguinte (14 dias), quando as células já apresentam confluência de 90-100%, o isolamento foi realizado.

Para isolamento de micróglia, as garrafas foram colocadas no agitador orbital aquecido a 37°C, 240 rpm por 2 horas e meia. Após isso, o sobrenadante (o qual contém as micróglia) foi coletado centrifugado e o *pellet* ressuspensionado em 1 ml de DMEM 10%SFB e mantido no gelo até o prosseguimento do protocolo.

Para isolamento dos astrócitos, as garrafas foram preenchidas novamente com DMEM 5% SFB e recolocadas para um novo processo de agitação, por 260 rpm a 37°C

por mais uma hora e meia. Após o tempo de agitação, o meio foi descartado e as garrafas foram lavadas 2 vezes com PBS 1x. Depois, 5 ml/garrafa de tripsina/EDTA (0.005%) foram adicionados e após 10 minutos de incubação a 37°C os sobrenadantes foram recolhidos para tudo de 15ml, e meio DMEN 10% SFB foi adicionado, completando 15 ml. O tubo com a suspensão foi então centrifugado a 4°C por 10 minutos a 2.000 rpm, o sobrenadante descartado e o *pellet* ressuspenso em 1 ml de DMEN 10% SFB.

Alíquotas da suspensão de micróglia e astrócitos foram recolhidas para análise da pureza através de citometria de fluxo. Marcação de F4/80 e CD11b e GFAP foram feitas para análise da população de micróglia e astrócitos, respectivamente, e a pureza foi considerada adequada para uso nos experimentos em amostras com 90% ou mais de positividade.

### **3.9. Quimeras**

Camundongos C57BL/6 e NLRP3<sup>-/-</sup> foram irradiados a 900 rads. Células da medula óssea de camundongos C57BL/6 e NLRP3<sup>-/-</sup> doadores foram isoladas e imediatamente transferidas para os camundongos irradiados. Células de animais WT foram transferidas para nocautes receptivos e vice-versa. Total de  $1 \times 10^7$  células/camundongo foram transferidas para os camundongos recipientes. 6 semanas após a transferência, análise da população de vários tipos celulares foi realizada em amostras de sangue dos animais irradiados, e animais saudáveis não submetidos a irradiação foram utilizados como controle. EAE foi induzida então nos animais quiméricos 6 semanas após a transferência

### **3.10. Co-cultura de BMDM, micróglia ou astrócitos com células Th1 ou Th17 polarizadas *in vitro***

Camundongos transgênicos 2D2 T, os quais possuem células T com receptor específico para MOG, foram utilizados como doadores de células. Após eutanásia, o baço e linfonodos drenantes desses animais foram removidos e células T CD4<sup>+</sup> naïve foram purificadas pelo *kit* de isolamento de células T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> através de *beads* magnéticas (Milteny Biotec.) de acordo com as instruções do fabricante.

Linfócitos foram adicionados a 2x10<sup>5</sup> células/poço e 10 ng/ml rIL-23, 20 ng/ml rIL-6 e 3ng/ml rTGF- $\beta$  para polarização de Th17 e 10ng/ml rIL-12 e 10 g/ml anti-IL-4 para diferenciação em Th1 foram utilizados em volume total 200 $\mu$ l de meio RPMI por poço em placa de 96 poços durante 6 dias em estufa a 37°C em uma atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>. Células T foram diferenciadas na presença de MOG<sub>35-55</sub> a 20 $\mu$ g/ml junto com as citocinas de diferenciação. Após o período de cultura, as células foram analisadas para a confirmação do fenótipo Th1 ou Th17 por FACS. Para a co-cultura, 2x10<sup>5</sup> células/poço de linfócitos foram utilizados sob as mesmas condições iniciais e 1x10<sup>5</sup> células/poço de BMDM, micróglia ou astrócitos previamente isolados foram adicionados a cultura. 14 horas após, o sobrenadante foi recolhido para análise de IL-1 $\beta$  por ELISA.

### **3.11. Microscopia confocal**

Placas de 24 poços com lamínulas foram incubadas com 200ml DMEN/poço por 3 horas previamente ao experimento e então aplicada a cultura celular. Após os estímulos, células foram fixadas em paraformoldeído 4% e armazenadas a 4°C até a marcação.

Para a marcação, tratamento com triton X-100 foi aplicado e posteriormente os respectivos anticorpos primários e secundários foram utilizados. Após a marcação com

anticorpo, as lamínulas foram transferidas para lâminas de microscópio contendo solução fixadora com DAPI (ProLong® Gold Antifade Mountant with DAPI (CAT#36931) e incubadas a temperatura ambiente no escuro *overnight*. No dia seguinte, as amostras foram armazenadas a -20°C até a análise no microscópio invertido confocal Zeiss 710.

### **3.12. Co-cultura de esplenócitos de camundongos naïve ou EAE com micróglia ou astrócitos**

Micróglia e astrócitos foram isolados conforme previamente descrito no item 3.9. Após isolamento, estas células foram ressuspensas a  $1 \times 10^7$  células/ml em um tubo de 15 ml e marcadas com CFDA *Cell Tracker* (Invitrogen Cat#V12883) a concentração final de 0.05  $\mu$ M a 37°C por 15 minutos no escuro. Posteriormente, as células foram lavadas e plaqueadas a  $2.5 \times 10^5$  células/poço em placa de 24 poços contendo lamínulas previamente incubadas em meio RPMI por 3 horas. Antes de aplicar as células proveniente dos camundongos, células da glia foram tratadas com LPS (1  $\mu$ g/ml) por 3 horas e então lavadas 3 vezes com PBS1x. Então, Esplenócitos isolados do baço de camundongos naïve ou EAE foram adicionados a cultura na proporção de 1:2 e 1:3 por 1 ou 3 horas. Lamínulas foram transferidas para lâminas de microscópio, fixadas e posteriormente analisadas por microscopia confocal conforme item 3.12.

### **3.13. Análises estatísticas**

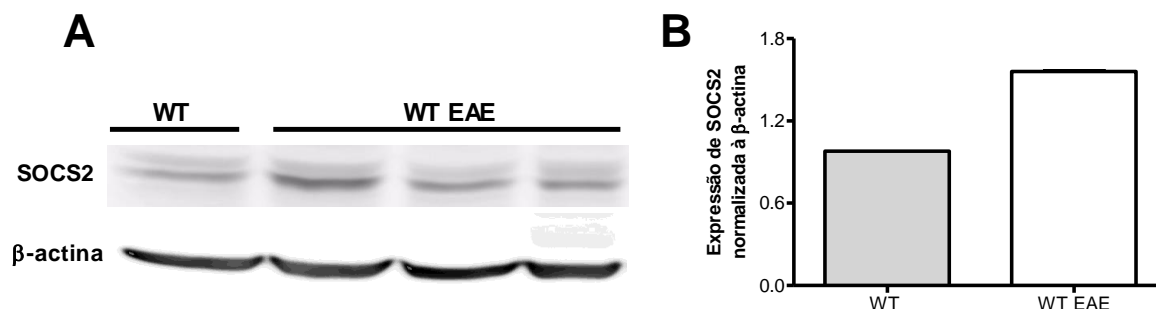
As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Prisma 4.0 (GraphPad, La Jolla, CA, USA). Os dados foram relatados de forma descritiva utilizando-se as medidas de tendência central média e desvio padrão e/ou mediana e erro padrão. O nível de significância considerado foi  $p < 0.05$  ou, em alguns dados,  $p < 0.001$ .

## 4. Resultados

### 4.1. Efeitos de SOCS2 na fase inicial de EAE

Como abordado anteriormente, EAE induzida por MOG em animais WT apresenta-se geralmente por uma fase inicial dos sintomas clínicos e, logo após alcançado o pico da doença, é observada a segunda fase que é a remissão. Pode ser feita uma correlação da fase inicial com os episódios de surto da doença humana, onde muitos dos parâmetros observados são semelhantes, tornando assim o estudo da mesma nos animais de muita relevância.

Primeiramente, foi induzida EAE nos animais WT. Em seguida, verificamos a expressão da proteína SOCS2 no cérebro desses camundongos. Verificou-se a expressão basal da proteína nas amostras de animais controles (Figura 3 A e B). Entretanto, após imunização, é observado um aumento nos níveis de SOCS2 no cérebro dos animais, o que pode sugerir um papel da molécula durante o desenvolvimento da doença (Figura 3 A e B).

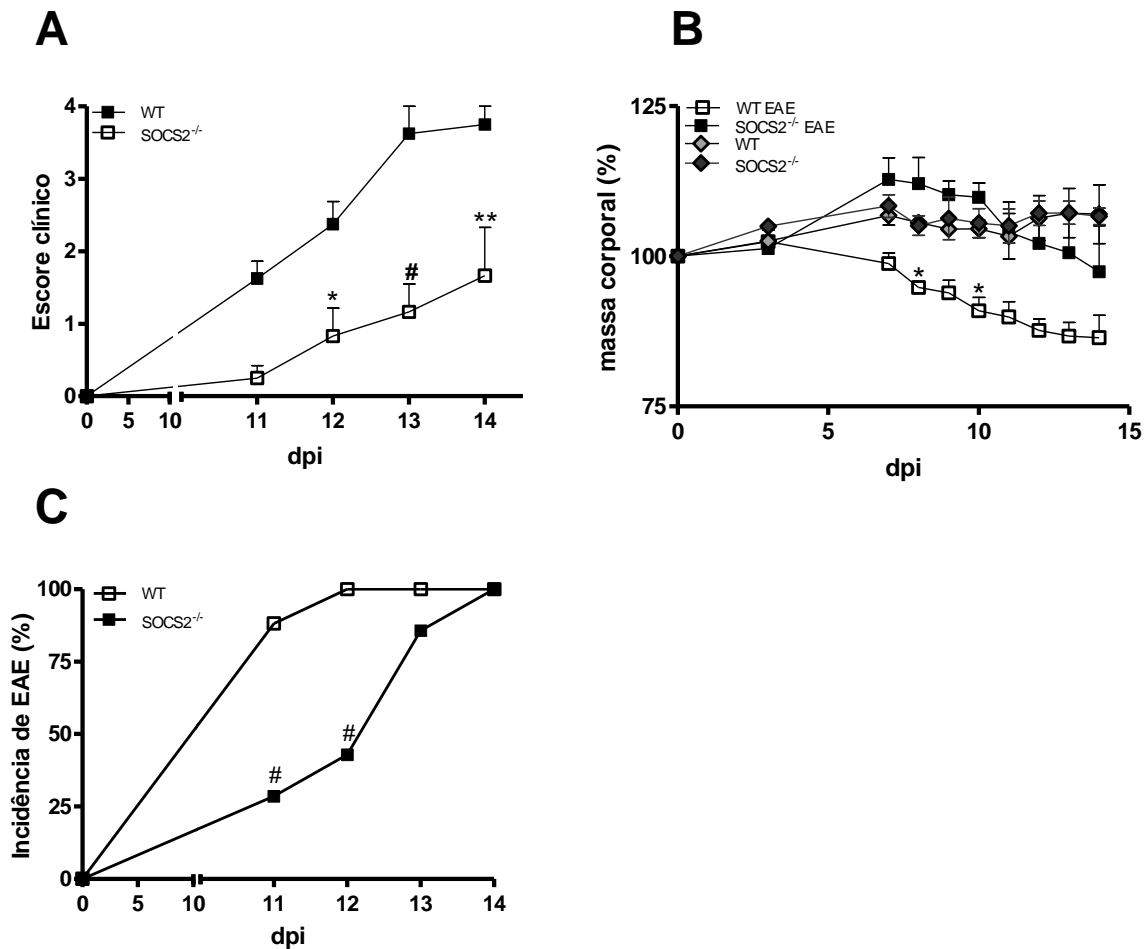


**Figura 3. Expressão de SOCS2 no cérebro de animais induzidos por EAE.** Amostras de cérebro de camundongos WT foram coletadas e homogeneizadas para as análises por Western Blotting. **(A)** Produção de SOCS2. **(B)** Gráfico de normalização e mostrado.  $\beta$ -actina foi usada como controle para normalização. Os dados são representativos de um em três experimentos independentes e apresentados como médias  $\pm$  SEM.

Observamos também o desenvolvimento da doença nos animais WT e SOCS2<sup>-/-</sup> até o pico da doença. Foi avaliado o score clínico e também o desenvolvimento da massa

corporal (Figura 4 A e B). Também, a incidência de animais que apresentaram qualquer sinal da doença em um determinado período de tempo é demonstrada (Figura 4 C).

Animais WT apresentaram o início dos sintomas em geral 11 dias após a imunização, alcançando o pico em 14 dpi (Figura 4 A). Por outro lado, os animais com deficiência de SOCS2 foram resistentes a EAE nesse período de tempo, com severidade claramente reduzida quando comparada com os animais do tipo selvagem (Figura 4 A). A evolução da massa corporal seguiu-se com uma correlação com a severidade clínica dos animais. Animais WT apresentaram significativa perda de peso, uma característica marcante da doença severa. Ao contrário, animais SOCS2<sup>-/-</sup> apresentaram massa corporal semelhante aos animais controles (Figura 4 B). Na fase inicial da doença, a deficiência de SOCS2 resulta em diminuição da incidência dos sinais clínicos quando comparado com os animais WT. No grupo deficiente de SOCS2, menos animais apresentaram qualquer sinal da doença em 11 e 12 dias após a indução (Figura 4 C). Por outro lado, animais WT apresentaram alta incidência da doença já no início da fase clínica da mesma, como esperado (Figura 4 C).



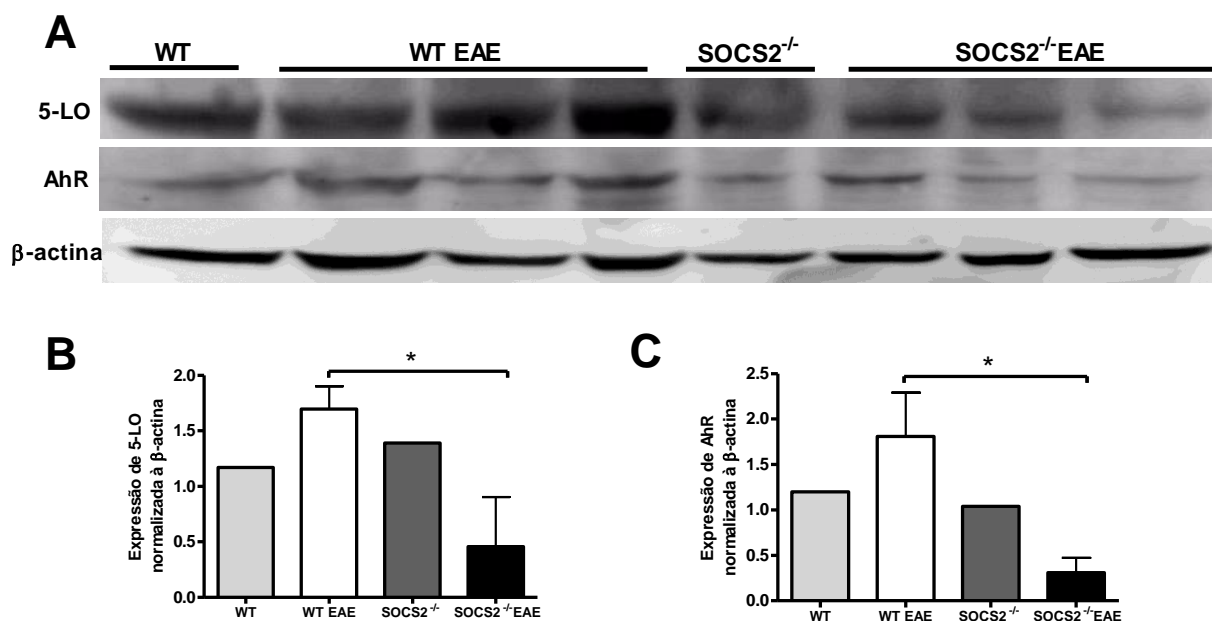
**Figura 4. Desenvolvimento de EAE em animais WT e SOCS2<sup>-/-</sup>.** Camundongos WT e SOCS2<sup>-/-</sup> receberam injeção subcutânea de MOG em CFA para a indução de EAE. Escore clínico (A), peso (B) e a incidência (C) de EAE foram monitorados. Os dados são representativos de um em três experimentos independentes e apresentados como médias +/- SEM. \*p < 0.05, \*\*p = 0.01, #p < 0.001.

#### 4.2. A expressão de SOCS2 é associada com a expressão de 5-LO/AhR durante EAE

Relatos na literatura demonstram que a expressão de SOCS2 pode ser influenciada por diferentes vias de sinalização, entre elas a via do ácido araquidônico, o qual pode ser processado pela enzima 5-LO, gerando mediadores que são capazes de se ligar ao receptor AhR e através deste regular a expressão do gene *socs2* (Machado *et al*, 2006;

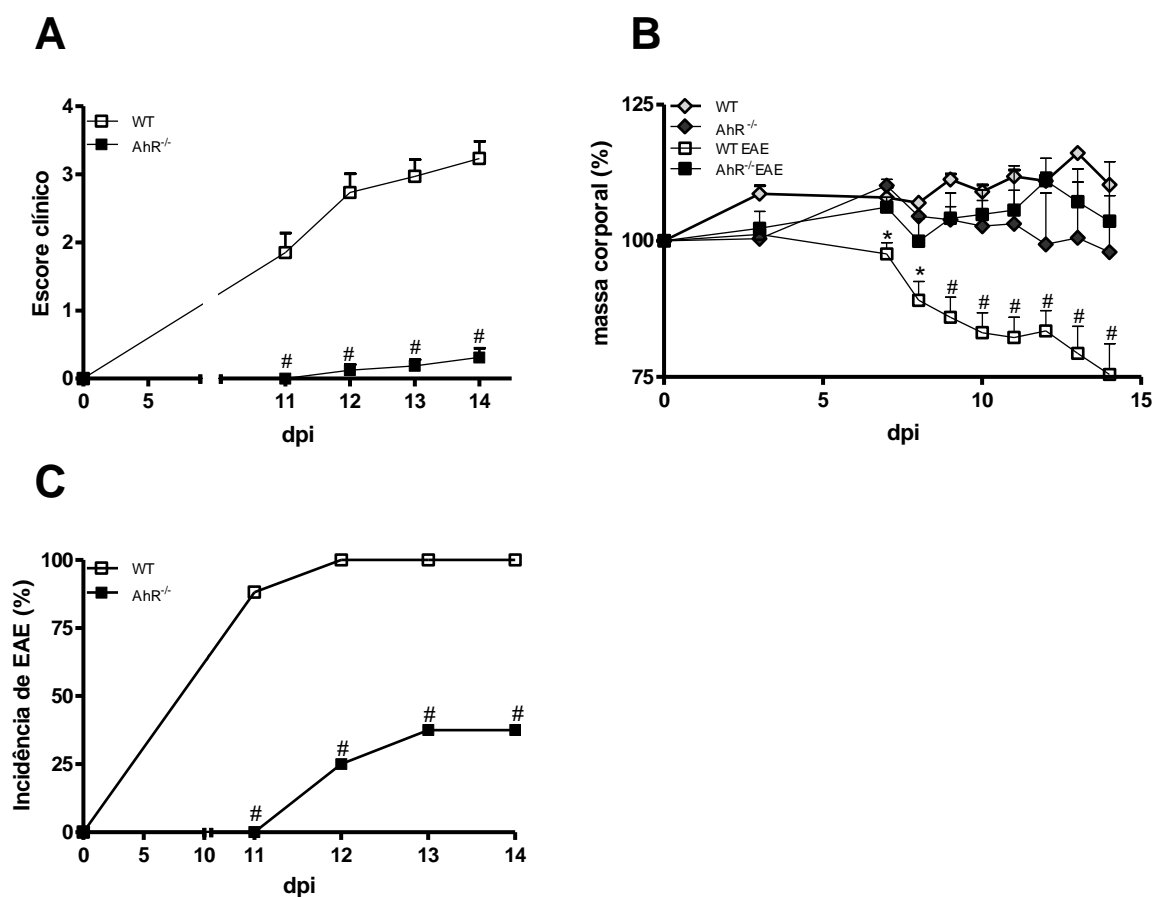


McBerry *et al*, 2012). Para verificar este mecanismo no modelo de EAE, nós inicialmente analisamos a expressão destas moléculas após imunização dos animais. EAE foi induzida nos animais WT e SOCS2<sup>-/-</sup> e os níveis de 5-LO e AhR no cérebro desses camundongos foram analisados por Western Blotting. Como demonstrado na figura 5, o nível de expressão tanto de 5-LO (Figura 5 A e B) quanto de AhR (Figura 5 A e C) é aumentado no cérebro dos animais WT aos 14 dias após a indução da doença. Em contrapartida, a deficiência de SOCS2 resultou em diminuição desses níveis durante o mesmo período de tempo (Figura 5 A-C). Esses dados sugerem que a expressão de SOCS2 é de alguma forma associada com a expressão de 5-LO/AhR durante o desenvolvimento da EAE.



**Figura 5. Expressão de 5-LO e AhR no cérebro de animais WT e SOCS2<sup>-/-</sup> 14 dias após indução de EAE.** Amostras de cérebro de camundongos WT e SOCS2<sup>-/-</sup> foram coletadas e homogeneizadas para as análises por Western Blotting. **(A)** Produção de 5-LO e AhR. Gráficos de normalização dos Blots para **(B)** 5-LO e **(C)** AhR são mostrados. β-actina foi usada como controle para normalização. Os dados são representativos de um em três experimentos independentes e apresentados como médias +/- SEM. \**p* < 0.05

Como mostrado na Figura 5, a expressão de SOCS2 está relacionada com a expressão de 5-LO/AhR. Diante disso, também foi induzida EAE em animais AhR<sup>-/-</sup> e comparamos o desenvolvimento da fase inicial da doença nesses animais e em animais WT. Assim como animais SOCS2<sup>-/-</sup>, os camundongos AhR<sup>-/-</sup> são resistentes a EAE. Eles apresentam severidade, perda de peso e incidência muito reduzidos em comparação aos animais do tipo selvagem na primeira fase de EAE (Figura 6 A, B e C).



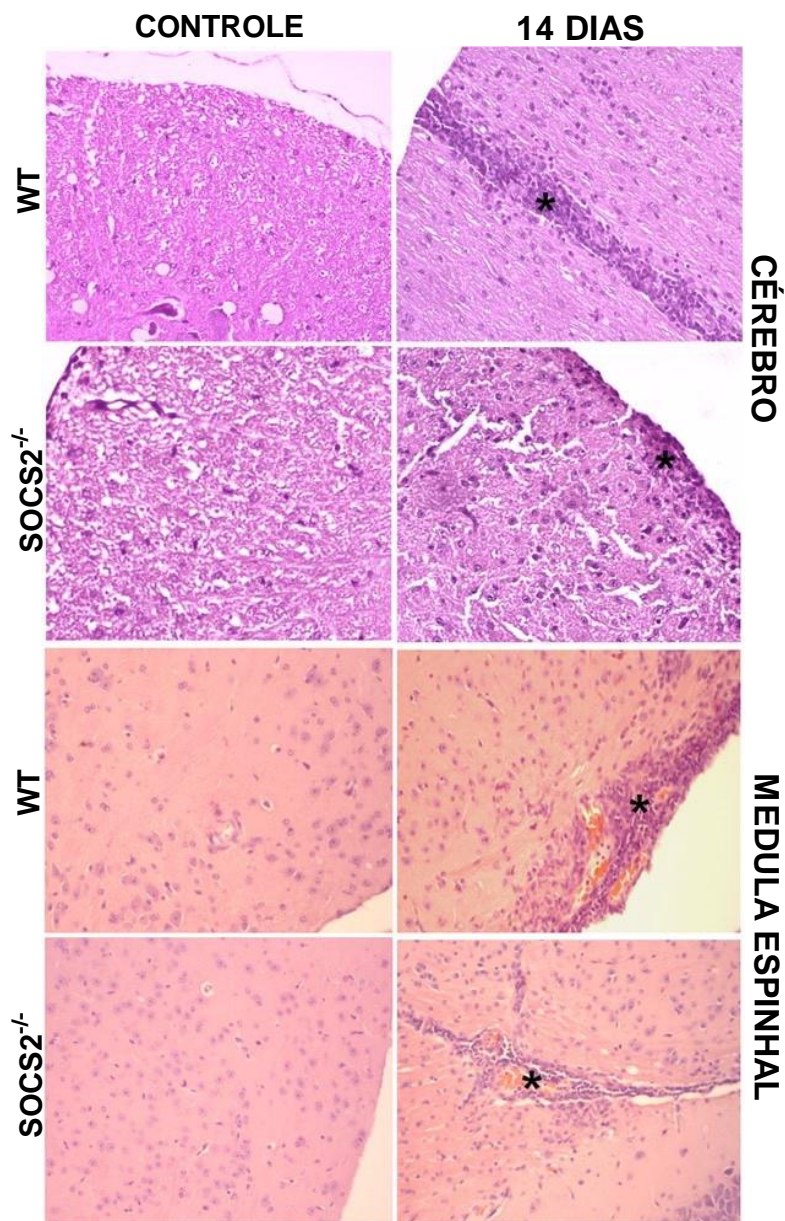
**Figura 6. Camundongos AhR<sup>-/-</sup> são altamente resistentes ao desenvolvimento de EAE na fase de pico da doença.** Camundongos WT e AhR<sup>-/-</sup> receberam injeção subcutânea de MOG em CFA para a indução de EAE. Score clínico (A), peso (B) e incidência de EAE (C) foram monitorados. Os dados são representativos de um em três experimentos independentes e apresentados como médias +/- SEM. \*p<0.05, #p<0.001

### **4.3. SOCS2 regula a inflamação no SNC dos camundongos durante a fase aguda de EAE**

A inflamação no SNC é um evento característico na EAE. A fase de pico de severidade associa-se com elevado nível de inflamação no tecido nervoso dos animais. Sendo assim, análises histológicas foram realizadas no cérebro e medula espinhal de animais WT e SOCS2<sup>-/-</sup> 14 dias após a indução da doença. Como visto na figura 7, os tecidos dos animais controle apresentaram aparência normal e saudável, sem qualquer alteração. Em relação aos tecidos de animais doentes, no cérebro a diferença no nível de inflamação foi marcante entre as duas linhagens de camundongos. As amostras de tecidos dos animais WT demonstraram um pronunciado infiltrado de células mononucleares no neuropil, predominantemente no tronco cerebral, sob o hipocampo. Por outro lado, os animais com deficiência de SOCS2 apresentaram menor dano cerebral ao longo do parênquima, com inflamação média (Figura 7). A medula espinhal dos animais WT apresentou alto nível de inflamação de mielina, com intenso infiltrado celular, diferentemente dos animais SOCS2<sup>-/-</sup>, os quais apresentaram mielite de média a moderada neste local (Figura 7). Esses dados correlacionam-se com o perfil clínico dos animais apresentado na figura 4.

O perfil de inflamação no SNC no pico da doença reflete diretamente nos aspectos locomotores dos animais. Como mostra a figura 8, os animais WT apresentam significativa debilidade locomotora, resultando em prostração devido à paralisia de membros; foi também observada incontinência urinária em alguns casos, indicativo de elevada severidade da doença. Ao contrário dos animais do tipo selvagem, os animais

deficientes de SOCS2 possuem uma leve dificuldade de equilíbrio em alguns casos, porém sem afetar de forma significativa a locomoção dos mesmos.



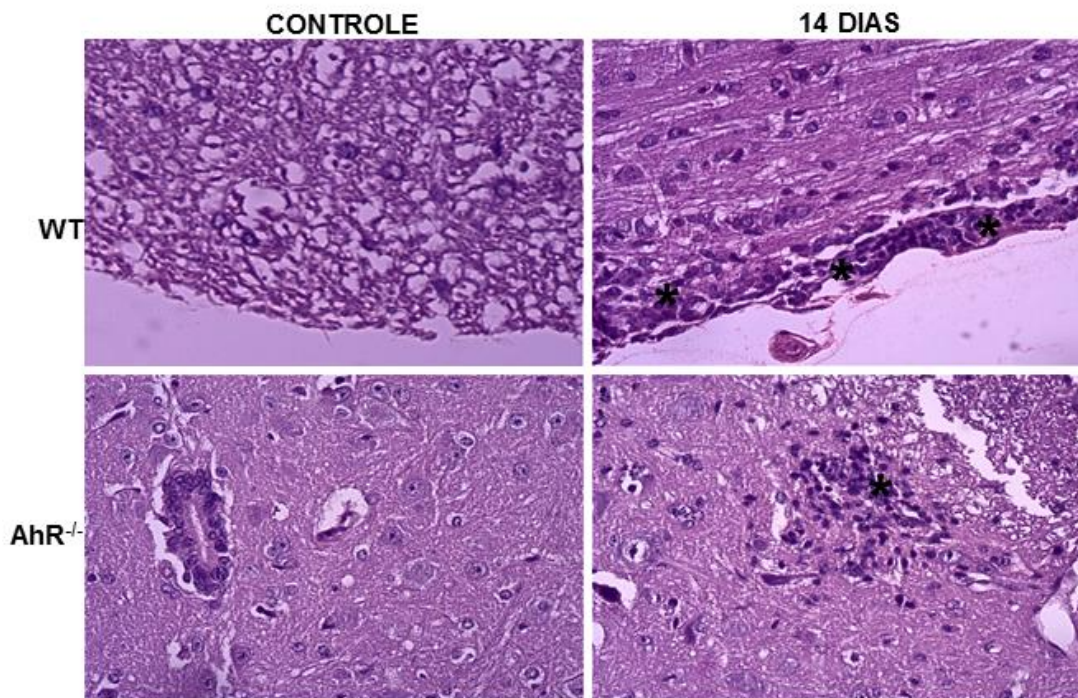
**Figura 7. A ausência de SOCS2 resulta em redução da inflamação no SNC durante a fase de pico da EAE.** Histologia de secções de cérebro (tronco cerebral) e medula espinhal de animais WT e deficientes em SOCS2 e mostrada. Os animais controle possuem aparência histológica normal. Cérebro: camundongos WT EAE mostraram um infiltrado intenso e extenso de células mononucleares (asterisco). Camundongos SOCS2 EAE com inflamação perivascular moderada (asterisco). Medula espinhal: camundongos WT induzidos por EAE mostraram intensa mielite caracterizada por infiltrado de células mononucleares (asterisco). Animais SOCS2 EAE com mielite média a moderada (asterisco). Ampliação original: 100x. Os dados são representativos de um em dois experimentos independentes.



**Figura 8. O perfil de inflamação no SNC dos animais reflete nos aspectos físicos dos mesmos.** Fotos representativas mostrando a aparência física dos camundongos WT e SOCS2<sup>-/-</sup> em 14 dpi. Os dados são representativos de um em três experimentos independentes.

Conforme estudos apresentados por outros grupos, AhR está envolvido de forma direta na severidade da EAE (Veldhoen *et al*, 2008; Lee *et al*, 2012; Duarte *et al*, 2013). Isso foi corroborado em nosso trabalho (Figura 6). Foi realizada então análise histológica da medula espinhal dos animais deficientes do receptor para análise da inflamação neste sítio a fim de relacioná-lo com o perfil clínico apresentado pelos animais. De fato, como mostrado na Figura 9, os animais deficientes de AhR induzidos por MOG desenvolvem inflamação discreta a moderada na medula espinhal 14 dias após imunização, reduzida se comparada com os animais WT (Figura 9). Os camundongos WT e AhR<sup>-/-</sup> controles apresentam histologia normal (Figura 9). Estes dados sugerem então a correlação entre a severidade reduzida nesses animais e o baixo nível de inflamação na medula espinhal. Diante disso, AhR bem como SOCS2 se mostram como moléculas de grande importância para o desenvolvimento de EAE nos animais, sendo que ambas estão relacionadas a papel prejudicial na fase inicial da doença.





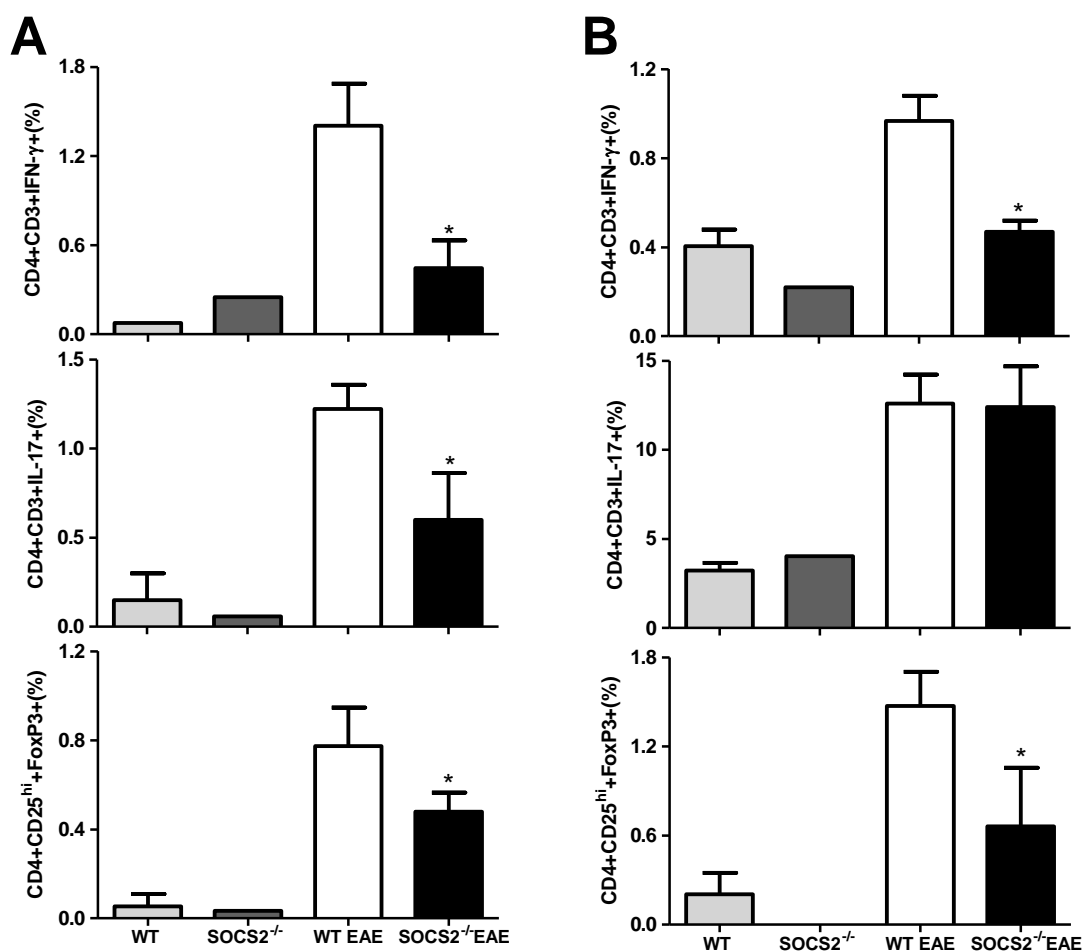
**Figura 9. Animais AhR<sup>-/-</sup> apresentam inflamação discreta a moderada na medula espinhal 14 dias após imunização com MOG.** Histologia de seções da medula espinhal de animais deficientes em AhR. Os animais AhR<sup>-/-</sup> não induzidos foram utilizados como controle e possuem aparência histológica normal. Camundongos induzidos por EAE mostraram mielite discreta a moderada em 14 dpi (**asterisco**). Amostras de animais saudáveis foram utilizadas como controle. Ampliação original: 100x. Os dados são representativos de um em dois experimentos independentes.

#### **4.4. A deficiência de SOCS2 resulta em alteração do infiltrado de linfócitos T no SNC**

Evento crucial para o estabelecimento do processo inflamatório no SNC após a indução é a chegada de células T CD4 que foram estimuladas na periferia. Estas células penetram o tecido nervoso e são os principais fatores desencadeadores da inflamação.

Análise por citometria de fluxo tanto no cérebro quanto na medula espinhal de 14 dpi revela que a deficiência de SOCS2 altera o infiltrado de células T no SNC. No cérebro, a frequência de linfócitos T expressando IFN- $\gamma$  e linfócitos T expressando IL-17 foi reduzida em amostras de animais SOCS2<sup>-/-</sup>, quando comparado com os animais do tipo

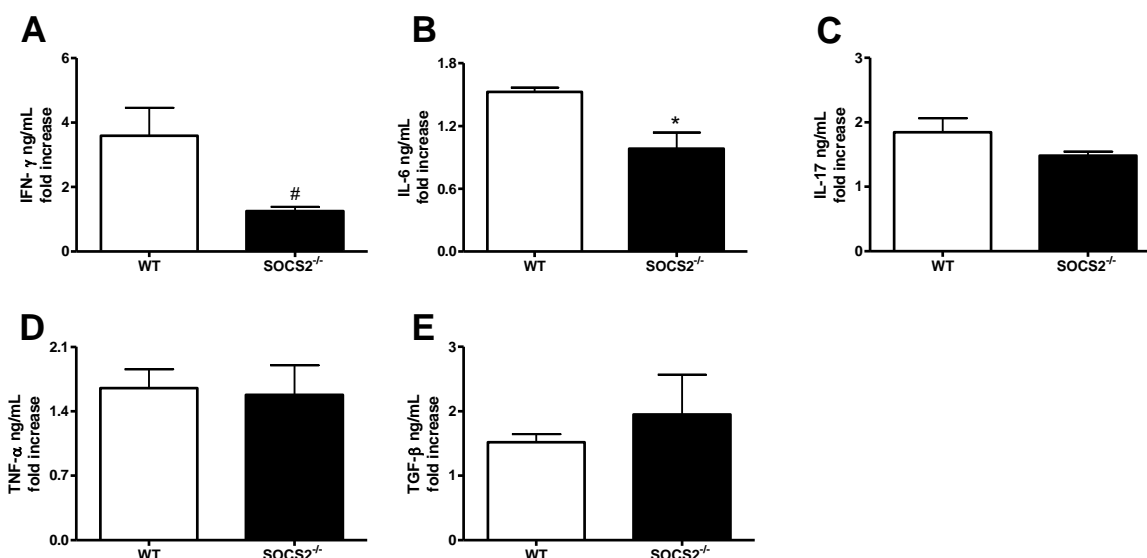
selvagem (Figura 10 A). Além do mais, a população de células Treg (FoxP3+) também foi reduzida nos animais deficientes (Figura 10 A). Em relação ao tecido medular, excetuando a população de linfócitos Th17 (IL-17+), a qual não apresentou diferença estatística entre ambas linhagens, o perfil do infiltrado de células T IFN- $\gamma$ + e FoxP3+ foi similar àquele encontrado no cérebro (Figura 10 B).



**Figura 10. SOCS2 regula o infiltrado de linfócitos no SNC durante EAE.** Em 14 dpi, o cérebro e medula espinhal de camundongos WT e SOCS2<sup>-/-</sup> foram coletados, homogeneizados e submetidos a análise por citometria de fluxo. A porcentagem de células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>FoxP3<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> do total foi avaliada no (A) cérebro e (B) medula espinhal. (N= 6 animais por grupo). Os dados são representativos de um em dois experimentos independentes. \* $p < 0.05$ .

#### 4.5. SOCS2 regula a secreção de importantes citocinas no SNC durante EAE

Após o acúmulo de células ativadas no SNC, a liberação de citocinas pelas mesmas possui importância crucial nos eventos inflamatórios. Realizamos então a análise de citocinas importantes no cérebro dos animais na fase de pico da doença. Como mostrado, tanto IFN- $\gamma$  quanto IL-6 são significativamente reduzidas nos animais deficientes de SOCS2 (Figura 11 A e B, respectivamente). Por outro lado, IL-17, TNF- $\alpha$  e a citocina reguladora TGF- $\beta$  não apresentam diferença significativa entre ambos grupos de camundongos (Figura 11 C-E, respectivamente).

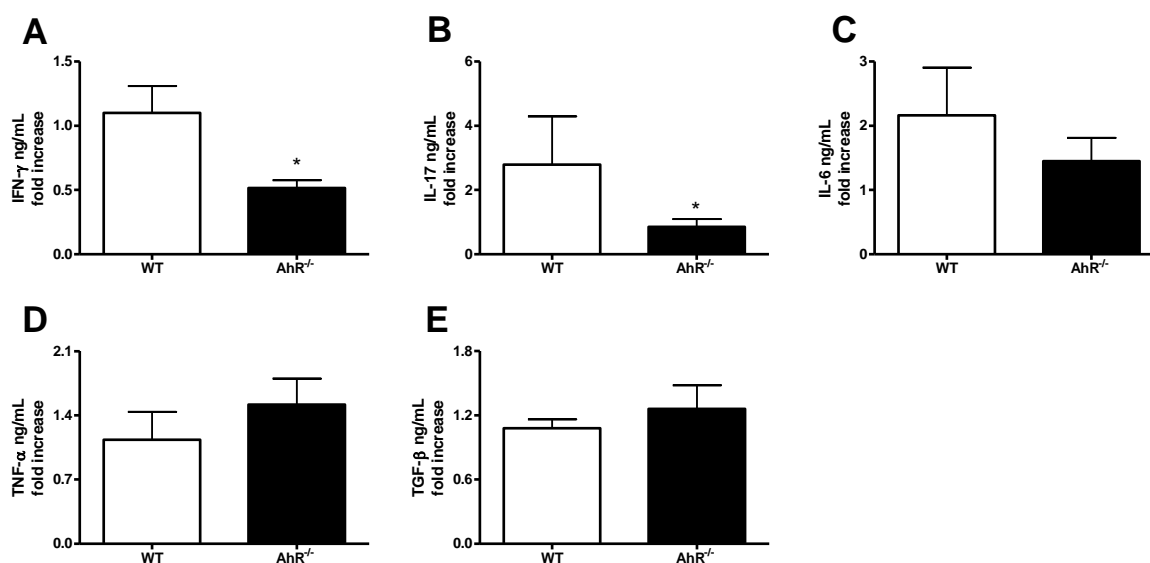


**Figura 11. Níveis de citocinas no cérebro de animais SOCS2 no pico de EAE.** Em 14 dpi, o cérebro dos camundongos WT e SOCS2<sup>-/-</sup> foram coletados, homogeneizados e submetidos a análise por ELISA. A secreção de (A) IFN- $\gamma$ , (B) IL-6, (C) IL-17 e (D) TNF- $\alpha$  e (E) TGF- $\beta$  foi medida. (N= 4 animais por grupo). Dados são representativos de um em três experimentos independentes e apresentados como médias +/- SEM. \* $p < 0.05$ , # $p < 0.001$

Paralelamente, foi realizada ELISA para análise da produção de algumas importantes citocinas no cérebro dos camundongos WT e AhR<sup>-/-</sup>, tais como IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-6, TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  (Figura 12 A-E, respectivamente). A secreção de IFN- $\gamma$  e IL-17 foi



reduzida nos animais deficientes de AhR (Figura 12 A e B, respectivamente). Por outro lado, a produção de TNF- $\alpha$ , IL-6 e TGF- $\beta$  não apresentou diferença estatisticamente significativa (Figura 12 C-E, respectivamente). Como discutido anteriormente, IFN- $\gamma$  e IL-17 são citocinas que possuem papel central durante o desenvolvimento de EAE, aumentando a inflamação no local e, com isso, resultando em danos ao SNC do animal.

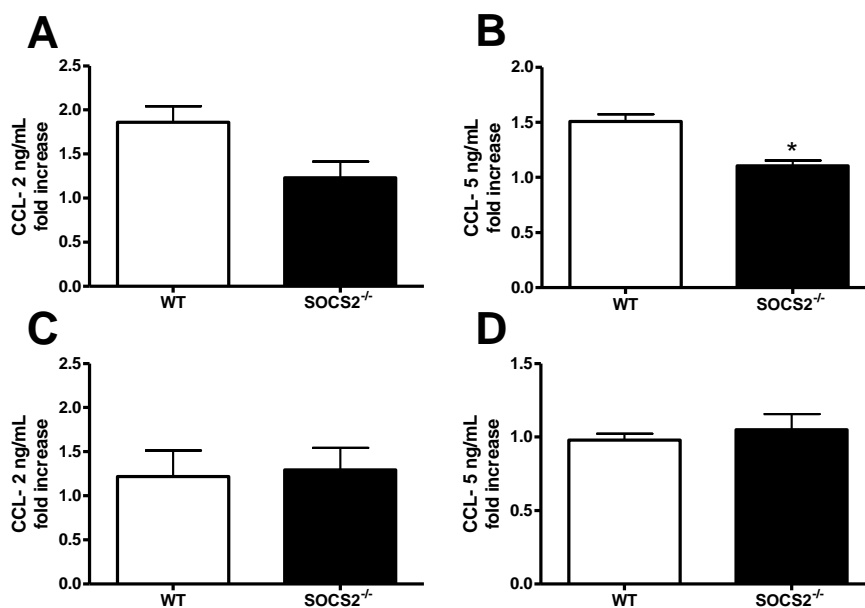


**Figura 12. A deficiência de AhR altera a produção de IFN- $\gamma$  e IL-17 nos animais 14 dias após a indução.** Em 14 dpi, o cérebro dos camundongos WT e AhR<sup>-/-</sup> foram coletados, homogeneizados e submetidos a análise por ELISA. A secreção de (A) IFN- $\gamma$ , (B) IL-17 (C) IL-6 (D) TNF- $\alpha$  e (E) TGF- $\beta$  foi medida. (N= 4 animais por grupo). Os dados são representativos de um em três experimentos independentes e apresentados como médias  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$

#### 4.6. A produção de CCL-5 é diminuída no cérebro de camundongos deficientes de SOCS2

Em seguida foi realizada a análise da secreção de CCL-2 e CCL-5 no cérebro (Figura 13 A e B) e também na medula espinhal (Figura 13 C e D). Como já discutido anteriormente, essas duas quimiocinas possuem importante papel em recrutar linfócitos T para o SNC durante o mecanismo inflamatório. A deficiência de SOCS2 associou-se com a diminuição de CCL-5 no cérebro dos animais com EAE (Figura 13 B). Por outro

lado, a produção de CCL-2 apresentou tendência menor de produção nos animais deficientes, porém não foi constatada diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Figura 13 A). Na medula espinhal, a produção dessas quimiocinas é similar entre os animais WT e SOCS2<sup>-/-</sup> (Figura 13 C e D). Esses dados sugerem que SOCS2 está associado com a produção de CCL-5, um fator crucial para o recrutamento de linfócitos T, no cérebro dos animais.

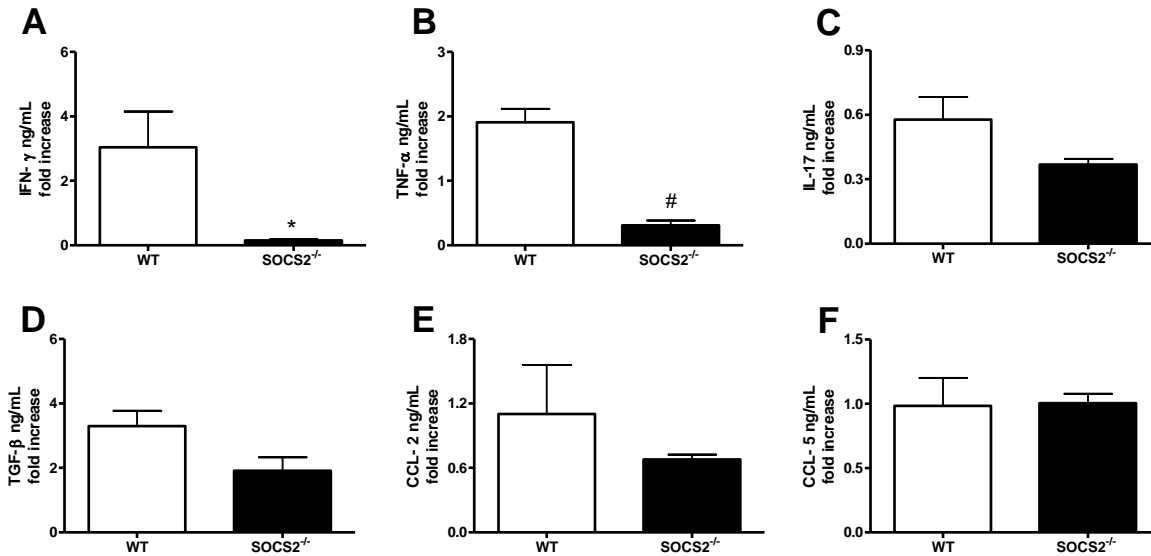


**Figura 13. O cérebro de animais SOCS2<sup>-/-</sup> apresenta alteração no nível de CCL-5 na fase de pico da doença.** Em 14 dpi, o cérebro e medula espinhal de camundongos WT e SOCS2<sup>-/-</sup> foram coletados, homogeneizados e submetidos a análise por ELISA. A secreção de CCL-2 e CCL-5 no cérebro (A e B) e medula espinhal (C e D) e apresentada. (N= 4 animais por grupo). Os dados são representativos de um em três experimentos independentes e apresentados como médias +/- SEM. \**p* <0.05.

#### 4.7. A ausência de SOCS2 altera a produção periférica de citocinas e quimiocinas

Verificamos também a produção de algumas citocinas e quimiocinas tanto no baço quanto no timo dos animais 14 dias após a indução de EAE. No baco, há reduzida

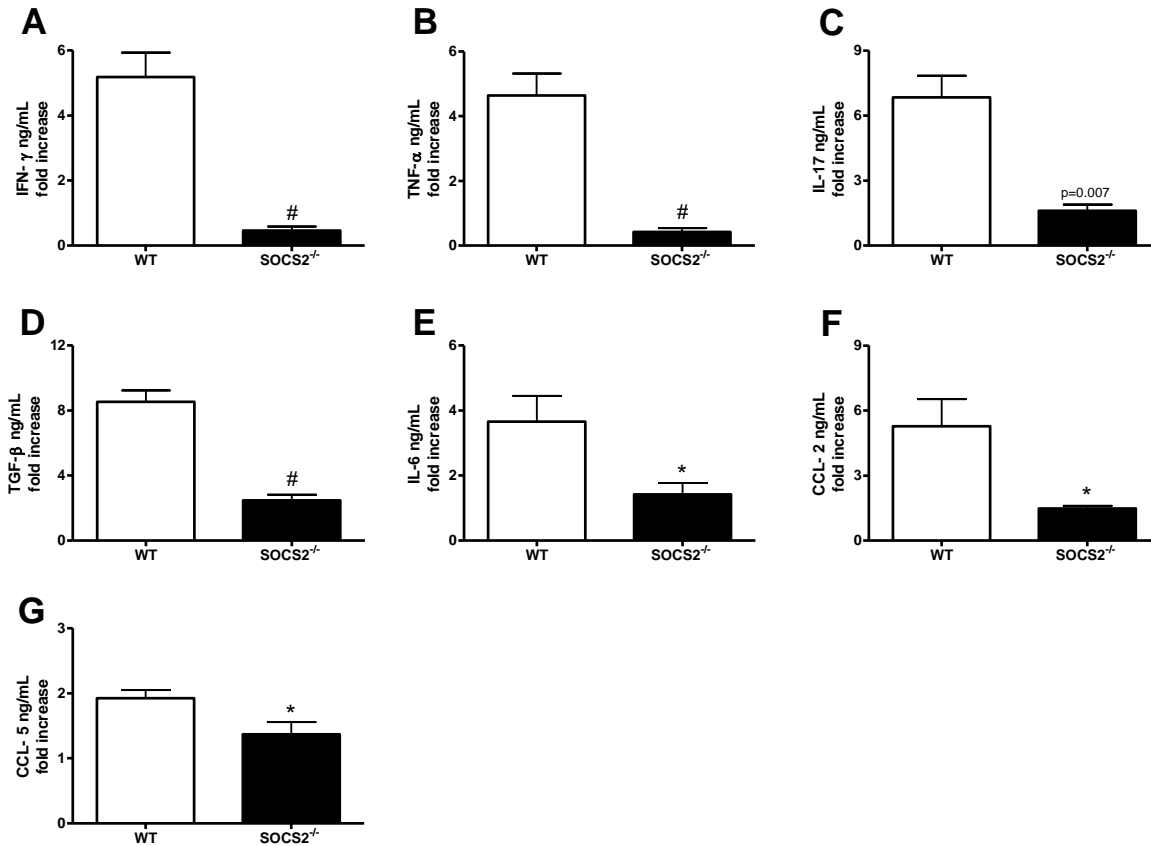
produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  nos animais nocautes (Figura 14 A e B, respectivamente). Já a produção de IL-17, TGF- $\beta$ , CCL-2 e CCL-5 não apresentou diferença entre ambos grupos de animais (Figura 14 C,D,E e F, respectivamente).



**Figura 14. Produção esplênica de citocinas e quimiocinas em 14 dpi.** Em 14 dpi, o baço dos camundongos WT e SOCS2<sup>-/-</sup> foram coletados, homogeneizados e submetidos a análise por ELISA. A secreção de **(A)** IFN- $\gamma$  **(B)** TNF- $\alpha$ , **(C)** IL-17, **(D)** TGF- $\beta$ , **(E)** CCL-2 e **(F)** CCL-5 foi medida. (N= 4 animais por grupo). Dados são representativos de um em três experimentos independentes e apresentados como médias +/- SEM. \* $p < 0.05$ , # $p < 0.001$

Por outro lado, no timo todas as moléculas analisadas apresentam significativa redução nos animais deficientes de SOCS2. Com isso, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17, TGF- $\beta$ , IL-6, CCL-2 e CCL-5 são diminuídas no timo desses animais (Figura 15 A-G, respectivamente).

Estes resultados sugerem que camundongos SOCS2<sup>-/-</sup> possuem deficiência na produção periférica de importantes citocinas e quimiocinas após a imunização com MOG.

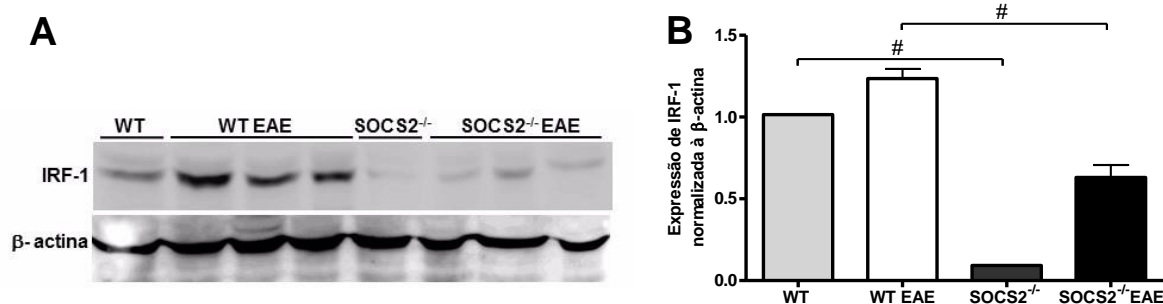


**Figura 15. Produção tímica de citocinas e quiocinas em 14 dpi.** Em 14 dpi, o cérebro dos camundongos WT e SOCS2<sup>-/-</sup> foram coletados, homogeneizados e submetidos a análise por ELISA. A secreção de (A) IFN- $\gamma$  (B) TNF- $\alpha$ , (C) IL-17, (D) TGF- $\beta$ , (E) CCL-2, (F) CCL-2 e (G) CCL-5 foi medida. (N= 4 animais por grupo). Dados são representativos de um em três experimentos independentes e apresentados como médias +/- SEM. \* $p < 0.05$ , # $p < 0.001$

#### 4.8. SOCS2 regula a expressão do Fator Regulatório de Interferon 1 (IRF-1) durante EAE

Após indução de EAE, IRF-1 induz a desmielinização no tecido nervoso dos animais e regula positivamente a expressão de Caspase-1. Foi analisada então a expressão de IRF-1 no cérebro de animais de ambas as linhagens por Western Blotting em 14 dpi (Figura 16 A e B). Como pode ser observado, a expressão de IRF-1 no cérebro dos animais deficientes para SOCS2 é fortemente reduzida, sugerindo que SOCS2 está

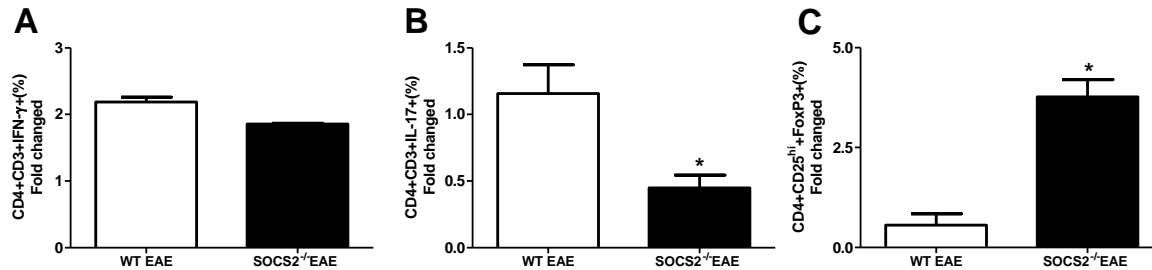
de alguma forma relacionado com a modulação da expressão de IRF-1 na EAE. É importante ressaltar que animais nocautes já apresentam redução significativa da expressão da molécula desde seus níveis basais, como verificado nas amostras dos animais controles WT e SOCS2<sup>-/-</sup> (Figura 16 A e B)



**Figura 16. A produção de IRF-1 é reduzida com a ausência de SOCS2 durante EAE.** Animais WT e SOCS2<sup>-/-</sup> receberam injeção subcutânea de MOG em CFA para a indução de EAE. **(A)** Amostras de cérebro de camundongos WT e SOCS2 KO foram coletadas e homogeneizadas para as análises de IRF-1 por Western Blotting. **(B)** Gráfico de normalização do Blot é mostrado.  $\beta$ -actina foi usada como controle para normalização. Dados representativos de um em três experimentos independentes. # $p < 0.001$

#### 4.9. A geração/expansão de células T no baço é alterada em animais deficientes de SOCS2

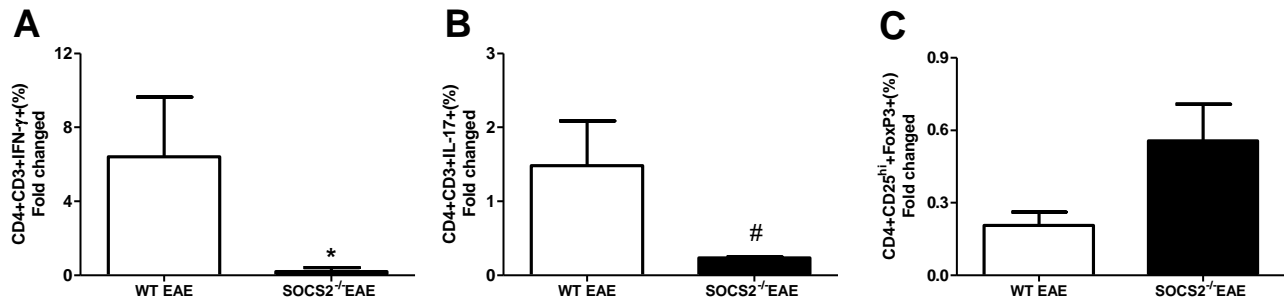
Depois, foi analisado o perfil populacional de células T na periferia, especificamente no baço, em 14 dpi. Como apresentado na Figura 17, linfócitos T positivos para IFN- $\gamma$  não apresentaram diferença entre ambas linhagens de animais. Em contrapartida, células T IL-17<sup>+</sup> foram reduzidas no baço de animais SOCS2<sup>-/-</sup> (Figura 17 B). Por outro lado, a população de linfócitos T FoxP3<sup>+</sup> é aumentada nos animais nocautes (Figura 17 C).



**Figura 17. Ausência de SOCS2 está relacionada com alteração da população de células Th17 e Treg no baço.** Em 14 dpi, o baço de camundongos WT e SOCS2<sup>-/-</sup> foram coletados, homogeneizados e submetidos a análise por citometria de fluxo. A porcentagem de células (A) CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IFN-γ<sup>+</sup>, (B) CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> e (C) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>+FoxP3<sup>+</sup> do total foi avaliada no baço (N= 6 animais por grupo). Os dados são representativos de um em dois experimentos independentes e apresentados como médias +/- SEM. \*p < 0.05.

#### 4.10. Camundongos SOCS2<sup>-/-</sup> têm deficiência na geração de células T inflamatórias nos estágios clínicos iniciais da EAE

Uma vez que células T inflamatórias estão reduzidas no SNC de animais nocautes assim como os linfócitos Th17 no baço desses animais na fase de pico da doença, nos perguntamos se a geração dessas células nos estágios anteriores ao pico já estaria prejudicada. Foi realizada então análise por citometria de fluxo para verificarmos as populações de células T no baço em 11 dpi, período de tempo o qual inicia-se os sinais clínicos da doença e onde é caracterizada a chegada dos linfócitos ao SNC. Como apresentado na Figura 18, tanto linfócitos expressando IFN-γ quanto aqueles expressando IL-17 foram reduzidos no órgão esplênico de camundongos SOCS2<sup>-/-</sup> em 11 dpi, indicando uma deficiência na sua geração desde os estágios iniciais pelos animais nocautes (Figura 18 A e B, respectivamente). A população de linfócitos Treg não apresentou diferença significativa entre ambas as linhagens de camundongos (Figura 18 C)

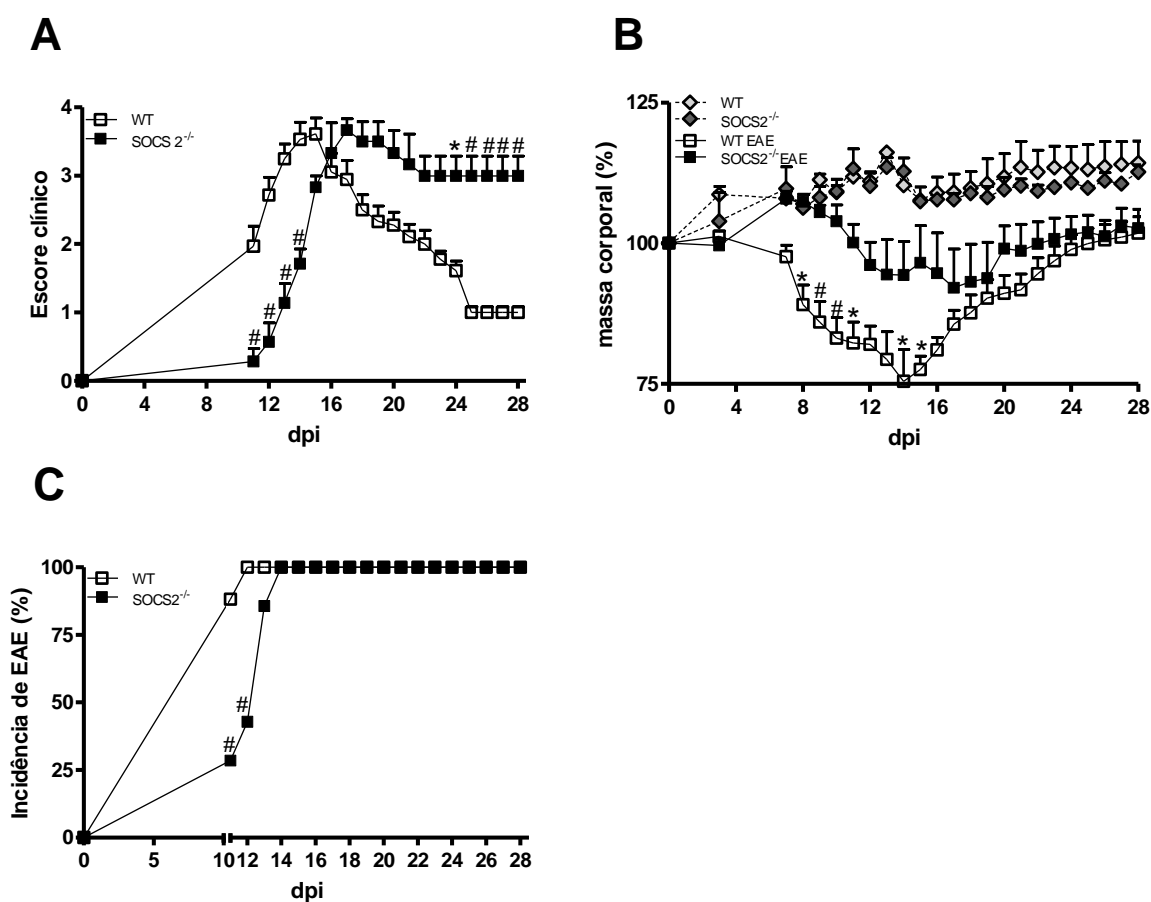


**Figura 18. Camundongos SOCS2<sup>-/-</sup> apresentam deficiência na geração esplênica de células inflamatórias nos estágios clínicos iniciais de EAE.** Em 11 dpi, o baço de camundongos WT e SOCS2<sup>-/-</sup> foram coletados, homogeneizados e submetidos a análise por citometria de fluxo. A porcentagem de células **(A)** CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IFN-γ<sup>+</sup>, **(B)** CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> e **(C)** CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>FoxP3<sup>+</sup> do total foi avaliada no baço. (N= 6 animais por grupo). Os dados são representativos de um em dois experimentos independentes e apresentados como médias +/- SEM. \**p* <0.05.

#### 4.11. A ausência de SOCS2 é benéfica no início da EAE, porém prejudicial na fase de recuperação da doença

Após a fase de pico inflamatório, ocorre a fase de remissão da doença onde os animais WT apresentam melhora dos sinais clínicos. Induzimos EAE nos animais do tipo selvagem e deficientes de SOCS2 e avaliamos o desenvolvimento da doença até a fase tardia da mesma, considerando 28 dpi como suficientes para a análise. Animais com ausência da proteína SOCS2 não possuem a capacidade de recuperação após o pico da doença (Figura 19 A-C). O pico de EAE nesses animais é alcançado tardiamente, em 17 dpi, o que é cerca de 3 dias após os animais WT (Figura 19 A). Porém, após o pico ser alcançado, de forma diferente dos animais do tipo selvagem, camundongos SOCS2<sup>-/-</sup> não possuem capacidade de recuperação dos danos agudos da doença. Eles iniciam o processo de remissão dos sinais clínicos, mas logo após isso os mesmos perdem o perfil remissivo observado no grupo WT, permanecendo com escore elevado até o final da avaliação (Figura 19 A). A perda de peso, bem como a recuperação da massa corporal

nesses animais é menos evidente quando se comparado com os animais WT (Figura 19 B). Além do mais, após 14 dpi todos os animais apresentam algum sinal clínico da doença, o que resulta em incidência igual entre ambas as linhagens (Figura 19 C). Juntos, esses resultados sugerem que a proteína SOCS2 possui importante papel também na segunda fase da doença, a fase de remissão. Porém, ao contrário da primeira fase de EAE, a ausência da proteína é prejudicial para a recuperação do animal.

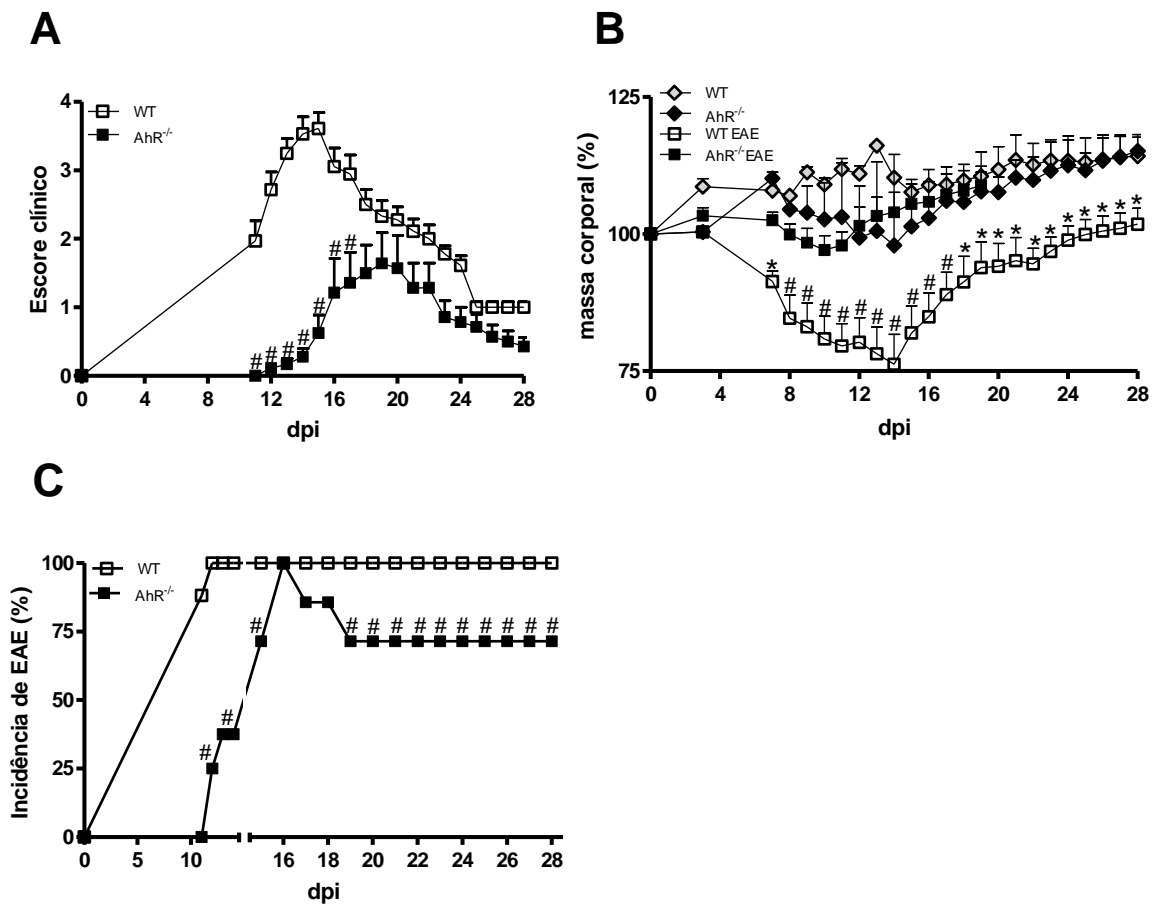


**Figura 19. SOCS2 é crucial para o processo de remissão dos sinais clínicos:** Camundongos WT e SOCS2<sup>-/-</sup> receberam injeção subcutânea de MOG em CFA para a indução de EAE. Escore clínico (A), peso (B) e a incidência (C) de EAE foram monitorados até 28 dias após indução. Os dados são representativos de um em três experimentos independentes e apresentados como médias +/- SEM. \* $p < 0.05$ , # $p < 0.001$ .



Diferentemente dos animais SOCS2<sup>-/-</sup>, camundongos deficientes de AhR são resistentes a severidade de EAE também na fase resolutive da doença. Os animais nocautes apresentaram escore reduzido em todos os períodos de tempo monitorados e o pico do grupo foi alcançado no dia 19 após a imunização, sendo logo depois observada a redução do mesmo (Figura 20 A). A massa corporal destes animais teve seu desenvolvimento de forma similar a dos camundongos controles (Figura 20 B). Com relação a incidência, exceto no dia 15, a qual foi a mesma (100%), esta foi sempre menor nos animais AhR<sup>-/-</sup> (Figura 20 C).

Juntos, esses dados sugerem que tanto AhR quanto SOCS2 desempenham papel importante no estabelecimento da EAE, porém SOCS2 se torna mais relevante durante a fase resolutive da doença.

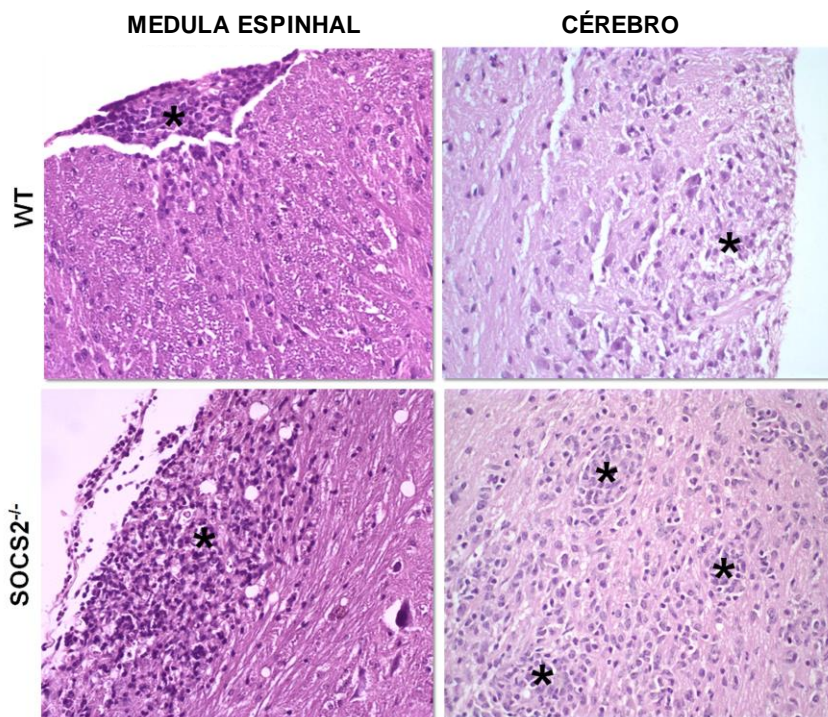


**Figura 20. Animais deficientes de AhR são resistentes a EAE.** Camundongos WT e AhR<sup>-/-</sup> receberam injeção subcutânea de MOG em CFA para a indução de EAE. Escore clínico (A), peso (B) e a incidência (C) de EAE foram monitorados até 28 dias após indução. Os dados são representativos de um em três experimentos independentes e apresentados como médias +/- SEM. \**p* < 0.05, #*p* < 0.001.

#### 4.12. O SNC de animais SOCS2<sup>-/-</sup> na fase tardia de EAE apresenta perfil inflamatório inverso do apresentado na fase de pico

Uma vez que na fase aguda da doença os animais WT possuem elevado nível de inflamação no SNC e os camundongos nocautes são acometidos de inflamação média a moderada (Figura 7), na fase tardia acontece exatamente o inverso. A medula espinhal dos animais nocautes possui desmielinização e meningiomielite intensa e extensiva,

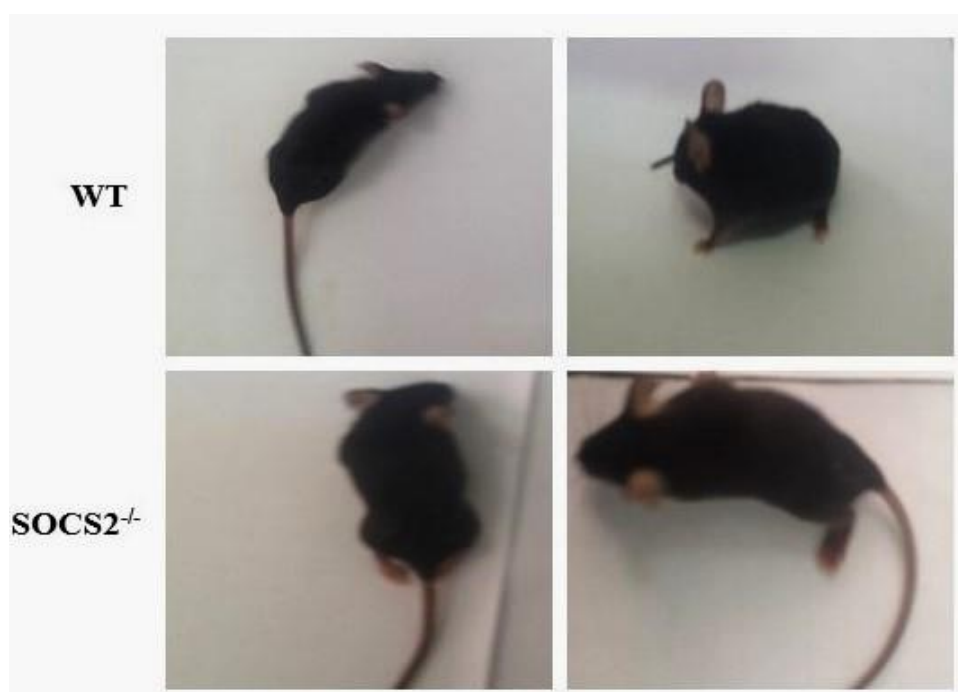
sendo que os WT exibem meningiomielite moderada a média (Figura 21). No cérebro, há infiltrado celular médio nos animais  $SOCS2^{-/-}$  e encefalite moderada nos camundongos do tipo selvagem (Figura 21).



**Figura 21. Animais  $SOCS2^{-/-}$  apresentam elevado nível de inflamação no SNC durante fase tardia de EAE.** Histologia de seções da medula espinhal e cérebro (tronco cerebral) de animais WT e deficientes em  $SOCS2$ . Os animais controle possuem aparência histológica normal (Figura 6 e dados não mostrados). **Medula espinhal:** camundongos WT induzidos por EAE exibiram meningiomielite focal média a moderada (**asterisco**). Animais  $SOCS2^{-/-}$  com EAE apresentaram desmielinização e meningiomielite intensa e extensiva (**asterisco**). **Cérebro:** camundongos WT EAE mostraram encefalite moderada (**asterisco**). Camundongos  $SOCS2^{-/-}$  EAE com infiltrado inflamatório médio (**asterisco**). Ampliação original: 100x. Os dados são representativos de um em três experimentos independentes.

Os aspectos locomotores dos animais também estão de acordo com estes dados. Em 28 dpi, a deficiência na locomoção é significativamente maior nos animais nocautes, com grande parte dos animais apresentando paralisia de cauda e de patas posteriores. Não é observada a incontinência urinária em ambas as linhagens. Os animais WT recuperam a capacidade de andar utilizando todas as patas, porém as sequelas da fase

aguda são presentes e estes apresentam pequena dificuldade locomotora ao andar (Figura 22). Estes resultados estão de acordo com a análise clínica observada durante essa fase da doença (Figura 19 A e B).



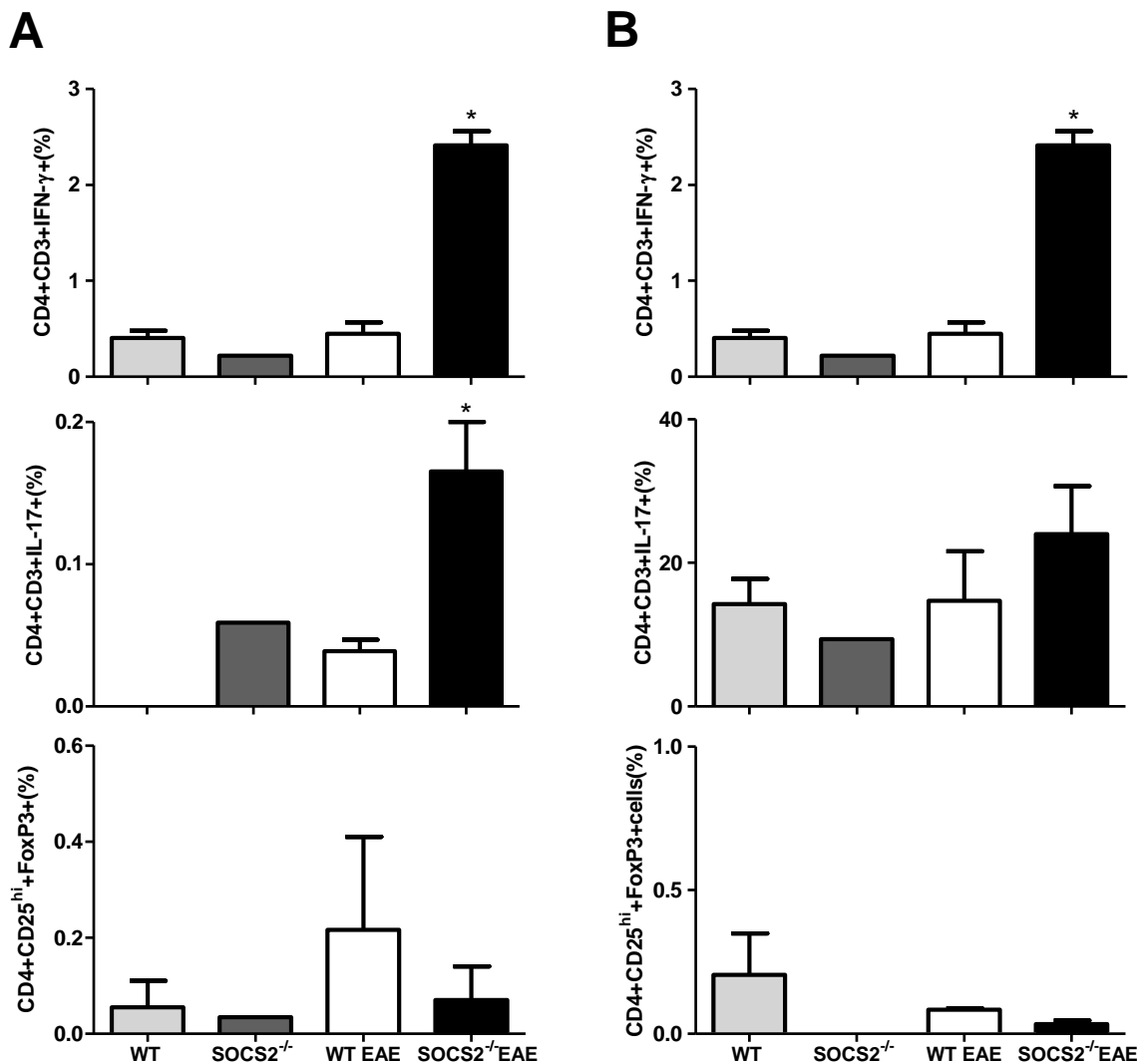
**Figura 22. Camundongos  $SOCS2^{-/-}$  possuem maior dificuldade locomotora 28 dias após imunização.** Fotos representativas mostrando a aparência física dos camundongos WT e  $SOCS2^{-/-}$  em 14 dpi. Os dados são representativos de um em três experimentos independentes.

#### **4.13. A população de células T inflamatórias é aumentada no SNC de animais $SOCS2^{-/-}$ na fase tardia de EAE**

Posteriormente, realizamos análise da população de linfócitos T CD4+ no cérebro e medula espinhal dos animais em 28 dias após a imunização, perfazendo a fase de remissão da doença. Fato importante é o controle da população de células inflamatórias nessa fase nos animais do tipo selvagem, o que está relacionado com a diminuição da

inflamação e subseqüentemente a remissão dos sinais clínicos da doença nos animais WT.

Ao contrário da fase aguda da doença, onde a população de linfócitos T é diminuída nos animais nocautes tanto no cérebro quanto na medula espinhal (Fig. 10 A e B, respectivamente), a fase tardia apresenta algumas alterações nesse quadro. Em 28 dpi, a população de células expressando IFN- $\gamma$  é significativamente maior tanto no cérebro quanto na medula espinhal dos animais deficientes de SOCS2 (Figura 23 A e B, respectivamente) quando comparamos com os animais WT. Por outro lado, a frequência de células T IL-17<sup>+</sup> também está maior no cérebro (Figura 23 A). Não detectamos diferença nessa população de células na medula espinhal entre ambas as linhagens de camundongos (Figura 23 B). Células expressando FoxP3 não apresentaram diferença entre os animais, tanto no cérebro quanto na medula espinhal (Figura 23 A e B, respectivamente).

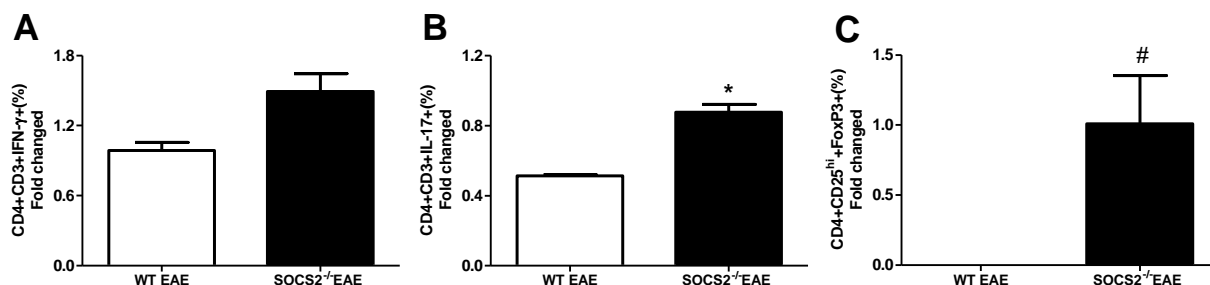


**Figura 183. A população de linfócitos T ativada é aumentada no SNC de animais SOCS2<sup>-/-</sup> na fase tardia de EAE.** Em 28 dpi, o cérebro e medula espinhal de camundongos WT e SOCS2<sup>-/-</sup> foram coletados, homogeneizados e submetidos a análise por citometria de fluxo. A porcentagem de células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>FoxP3<sup>+</sup> do total foi avaliada no (A) cérebro e (B) medula espinhal. (N= 6 animais por grupo). Os dados são representativos de um em dois experimentos independentes e apresentados como médias +/- SEM. \* $p < 0.05$ .

#### 4.14. O baço deficiente de SOCS2 produz mais linfócitos T IL-17+ e FoxP3+ na fase tardia de EAE

Como vimos na figura 18, há geração/expansão reduzida de linfócitos expressando IFN- $\gamma$  no baço de animais nocautes na fase de pico da doença. Entretanto, na fase de

remissão não ocorre diferença na frequência desse tipo celular entre ambas as linhagens de camundongos com EAE. Por outro lado, a população de células T IL-17+ bem como aquelas expressando FoxP3 foi significativamente aumentada nos animais deficientes de SOCS2 (Figura 24 B e C, respectivamente). Juntos, estes dados sugerem que animais deficientes não possuem aparentemente dano na produção de células T esplênicas na fase tardia da doença, pelo contrário, com aumento de sua produção quando comparado com os animais do tipo selvagem no mesmo período de tempo.

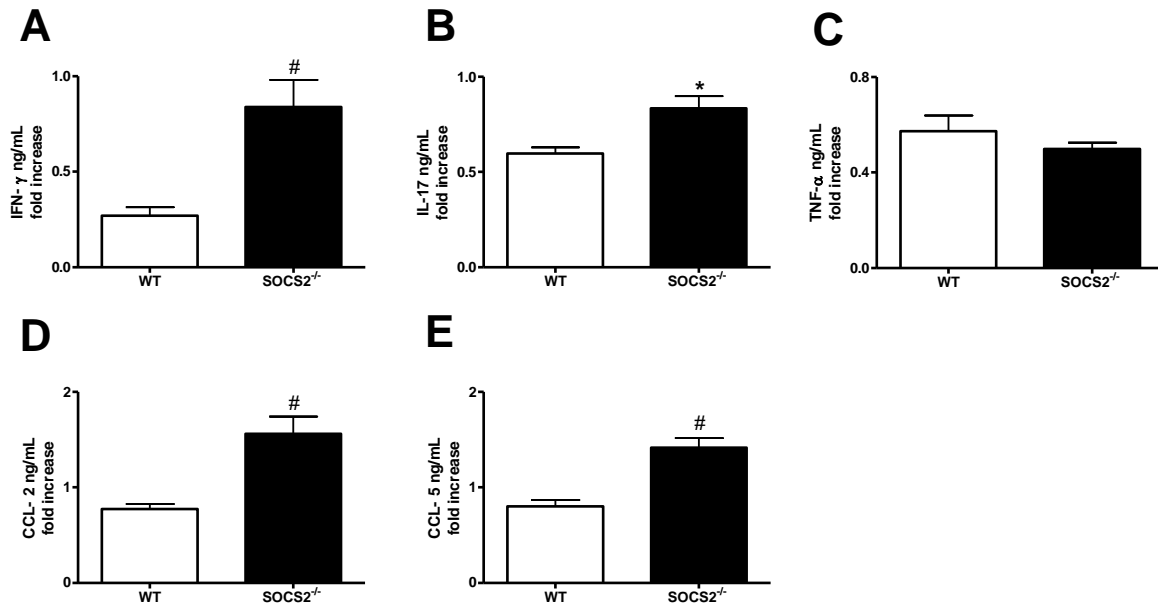


**Figura 194. O baço deficiente de SOCS2 produz mais linfócitos T na fase tardia de EAE.** Em 28 dpi, o baço de camundongos WT e SOCS2<sup>-/-</sup> foi coletado, homogeneizado e submetido a análise por citometria de fluxo. A porcentagem de células (A) CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, (B) CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> e (C) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>FoxP3<sup>+</sup> do total foi avaliada. (N= 6 animais por grupo). Dados são representativos de um em dois experimentos independentes e apresentados como médias +/- SEM. #*p* <0.001.

#### 4.15. Fatores inflamatórios são elevados no cérebro de animais SOCS2<sup>-/-</sup> 28 dias após a indução de EAE

Para corroborar com os resultados de histologia e da população de células T, avaliamos os níveis de IFN- $\gamma$ , IL-17, TNF- $\alpha$  (Figura 25 A-C, respectivamente) assim como das quimiocinas CCL-2 e 5 (Figura 25 D e E, respectivamente) no cérebro dos animais 28 dias após a imunização dos mesmos com MOG. Encontramos que tanto IFN- $\gamma$  quanto IL-17 estão aumentadas nos animais com deficiência de SOCS2 (Figuras 25 A e B,

respectivamente). Não foi verificada diferença nos níveis de TNF- $\alpha$  entre as duas linhagens de camundongos (Figura 25 C). Por outro lado, níveis aumentados de CCL-2 e CCL-5 foram detectados nas amostras de animais nocautes quando comparado com o grupo do tipo selvagem (Figuras 25 D e E, respectivamente).



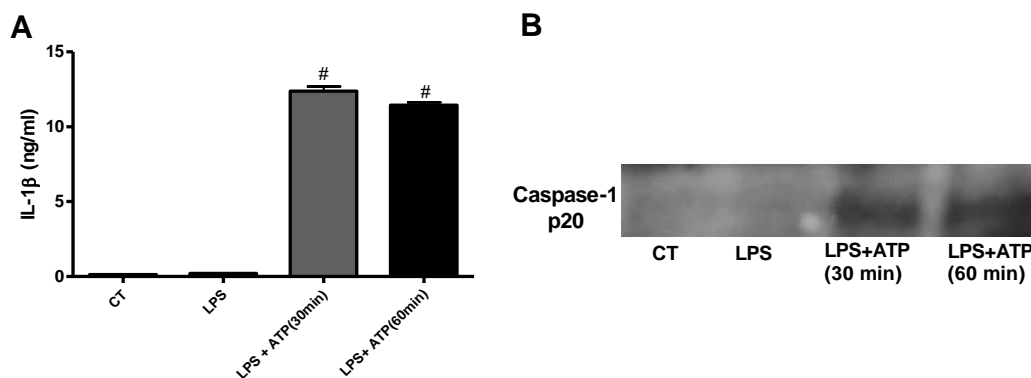
**Figura 25. Produção de fatores inflamatórios no cérebro dos animais em 28 dpi.** Em 28 dpi, o cérebro dos camundongos WT e SOCS2<sup>-/-</sup> foram coletados, homogeneizados e submetidos a análise por ELISA. A secreção de (A) IFN- $\gamma$  (B) TNF- $\alpha$ , (C) IL-17, (D) CCL-2 e (E) CCL-5 foi medida. (N= 4 animais por grupo). Dados são representativos de um em três experimentos independentes e apresentados como médias +/- SEM. \* $p < 0.05$ , # $p < 0.001$

De acordo com resultados preliminares do grupo, SOCS2 pode estar envolvido na regulação negativa de NLRP3 durante a EAE. Além do mais, recentes estudos demonstram que outro membro da família SOCS, SOCS1, inibe a atividade do inflamassoma após tratamento com IFN- $\beta$  em animais com EAE (Inoue *et al*, 2012). Diante disso, a partir de agora focamos nosso estudo sobre a importância de NLRP3 em células residentes do SNC durante EAE.



#### 4.16. O inflamassoma NLRP3 é fortemente responsivo ao estímulo de ATP em macrófagos derivados da medula óssea (BMDM)

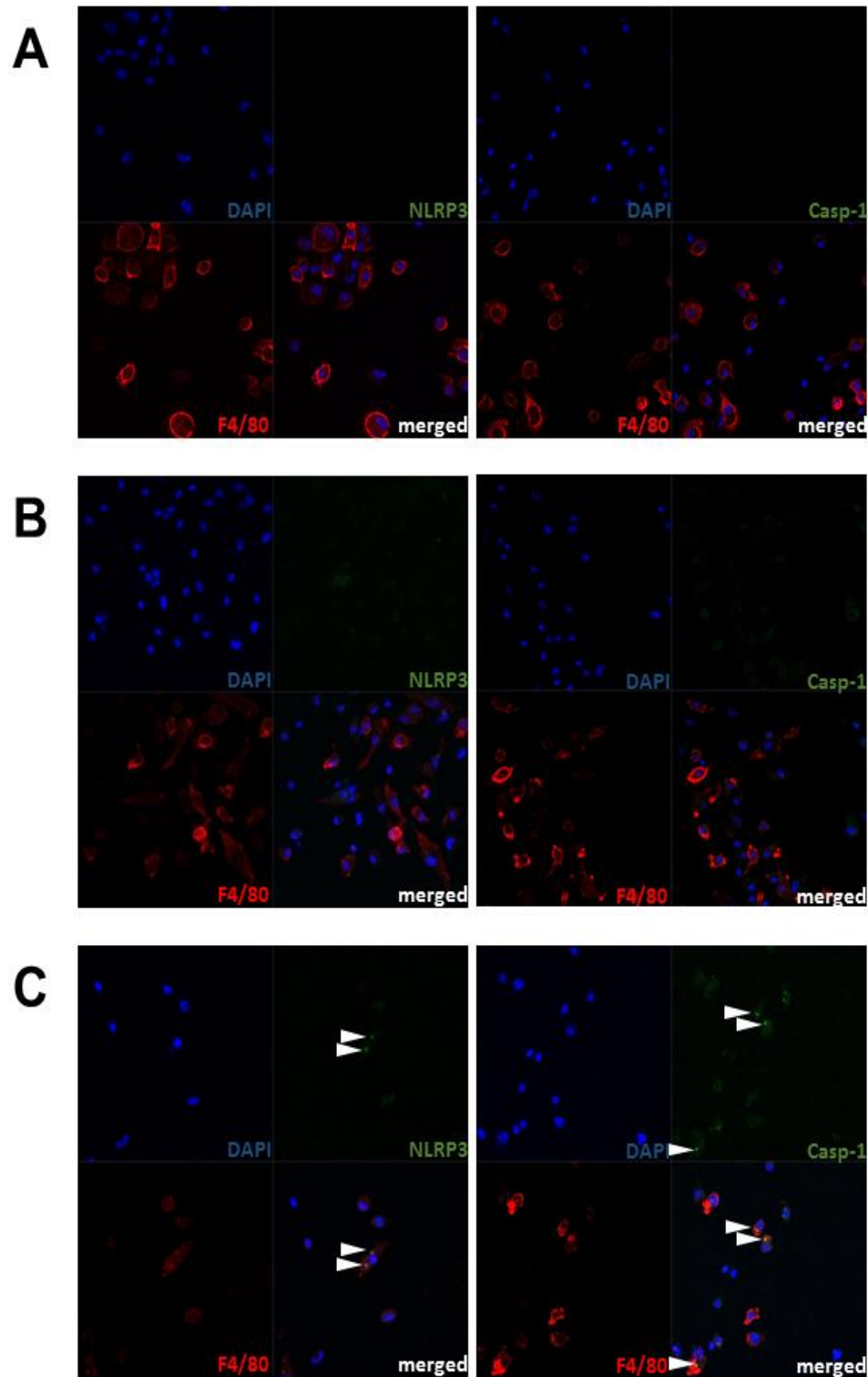
Como experimentos iniciais, nós analisamos a ativação de NLRP3 após estímulo com um dos seus melhores agonistas, o ATP. Células BMDM (*Bone Marrow-Derived Macrophages*: macrófagos derivados da medula óssea) foram tratadas com LPS ou LPS+ATP. O tratamento com LPS se deu por 3 horas e após isso o ATP foi aplicado por 30 ou 60 minutos. Células não tratadas foram utilizadas como controle. Primeiramente, foi avaliada a secreção de IL-1 $\beta$  e caspase-1 ativada no sobrenadante da cultura, através do ensaio de ELISA e WB, respectivamente (Figura 26 A e B). Como esperado, o tratamento com LPS não induziu a expressão tanto de IL-1 $\beta$  (Figura 26 A) quanto de caspase-1 (Figura 26 B). Por outro lado, a adição do ATP após o tratamento com LPS resulta em alto nível de secreção de ambas moléculas ativadas. A estimulação de ATP tanto com 30 minutos quanto em 60 minutos aumentou de forma similar a liberação de IL-1 $\beta$  (Figura 26 A) e caspase-1 clivada (Figura 26 B). Diante disso, em todos os experimentos posteriores assumimos o estímulo de ATP por 30 minutos.



**Figura 26. BMDM secretam altos níveis de IL-1 $\beta$  e caspase-1 clivada após estímulo com ATP.** BMDM foram tratadas com LPS por 3h e estimuladas ou não com ATP por 30 e 60 minutos. O sobrenadante da cultura foi coletado e análise de (A) IL-1 $\beta$  por ELISA e (B) caspase-1 por W.B. foi realizada. Amostras de células não tratadas foram utilizadas como controle. Dados são representativos de um em três experimentos independentes e apresentados como médias  $\pm$  SEM. # $p < 0.001$ .

Em seguida, foi realizada análise da ativação do inflamassoma em BMDM por microscopia confocal. Através dessa técnica, após a marcação com os anticorpos que reconhecem os componentes do inflamassoma, pode-se verificar diretamente a formação do complexo através da visualização dos *specks*. F4/80 foi aplicado para a marcação das células BMDM e anticorpos para NLRP3 ou Caspase-1 foram utilizados para avaliação do inflamassoma. DAPI foi utilizado para a marcação do núcleo celular. Como mostrado na Figura 27, células não tratadas e aquelas tratadas apenas com LPS não apresentam a formação dessas partículas (Figura 27 A e B, respectivamente). Por outro lado, fomos capazes de encontrar os *specks* quando estimulamos as células com ATP após tratamento com LPS (Figura 27 C).

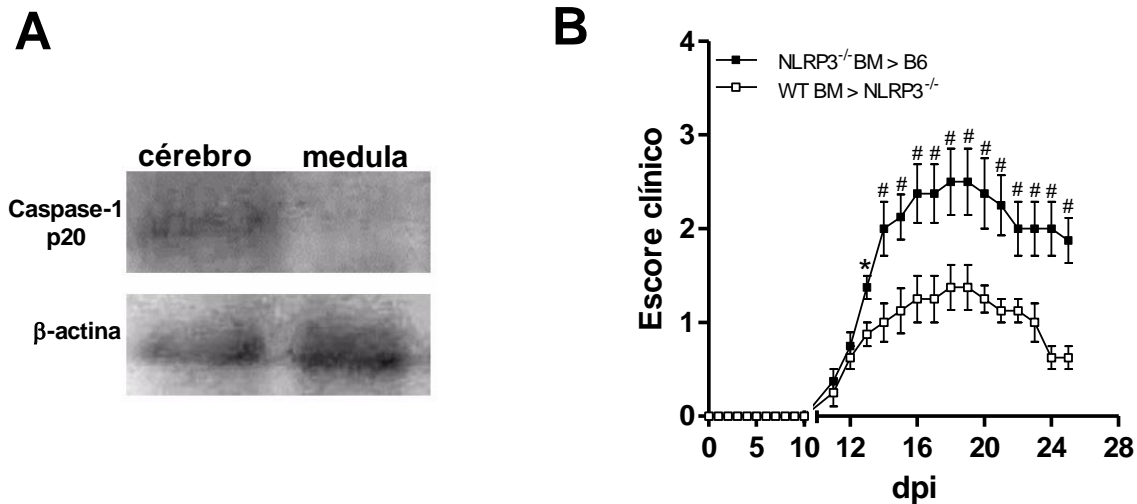
Uma vez que as células BMDM apresentam eficiente ativação do inflamassoma NLRP3 após estímulo com ATP, essas células foram utilizadas como controles positivos em experimentos posteriores.



**Figura 207. ATP induz a formação dos *specks* de NLRP3 em BMDM. (A)** Células não tratadas foram utilizadas como controle. **(B)** Células BMDM foram tratadas com LPS por 3 horas. **(C)** Após tratamento com LPS, células foram estimuladas com ATP por 30 minutos. Microscopia confocal foi realizada e as células foram marcadas para o núcleo (DAPI), NLRP3 ou Caspase-1 e F4/80. *Specks* são indicados pelas setas. Dados são representativos de um em três experimentos independentes.

#### **4.17. A atividade do inflamassoma NLRP3 no SNC é um fator que amplifica a severidade de EAE**

Não está esclarecido ainda se a atividade de NLRP3 especificamente no SNC é um fator importante durante a EAE. Diante disso, inicialmente nós avaliamos a secreção de caspase-1 por células F4/80+ do cérebro e medula espinhal dos animais no pico da doença. Para tal, os tecidos de 4 animais imunizados foram utilizados e processados para isolamento de células F4/80+. Após isolamento, essas células foram plaqueadas e mantidas em cultura por 24 horas. Após o período de incubação, o sobrenadante e o lizado celular foram utilizados para WB. Como indicado na Figura 28 A, há ativação da caspase-1 no SNC, ao menos no cérebro, de animais durante a fase de pico. Entretanto, apenas com esse resultado não podemos ainda estabelecer se essa ativação de caspase-1, a qual sugere atividade do inflamassoma NLRP3, ocorre em células residentes do SNC ou se provém de células que infiltraram o tecido após o início da doença. Para confirmarmos a importância de NLRP3 especificamente no SNC durante o desenvolvimento da doença, foram desenvolvidas quimeras com camundongos WT e NLRP3<sup>-/-</sup>. A irradiação elimina células da medula óssea, porém as células do SNC são resistentes. Após a irradiação em animais WT e deficientes de NLRP3, a transferência de células WT para camundongos recipientes NLRP3<sup>-/-</sup> e vice-versa foi realizada e, 6 semanas após, a EAE foi induzida. Como podemos observar na Figura 28 B, animais NLRP3<sup>-/-</sup> que receberam células de medula óssea de camundongos WT desenvolvem EAE de forma menos severa. Isso sugere que NLRP3 especificamente no SNC é um fator que amplifica a severidade de EAE.



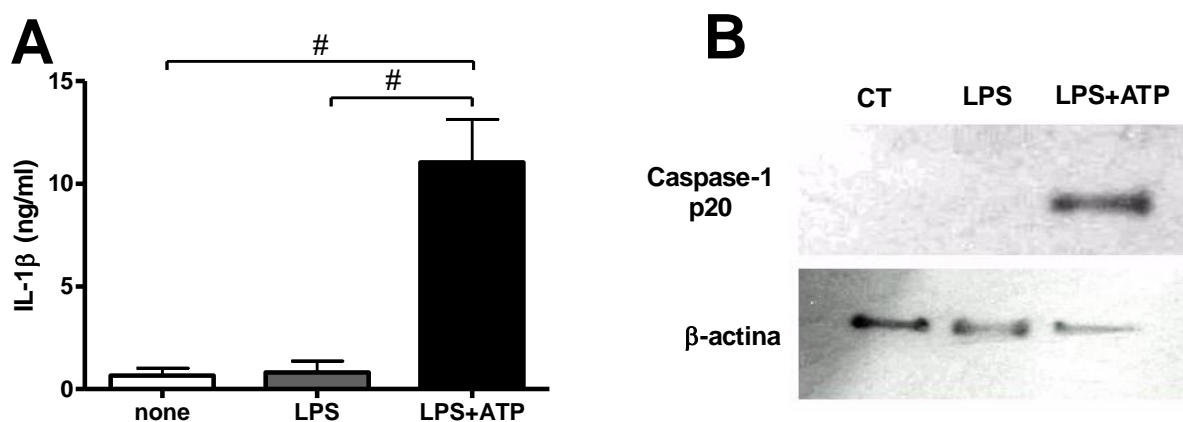
**Figura 28. A atividade de NLRP3 é importante para a amplificação da severidade de EAE. (A)** EAE foi induzida nos animais WT e 17 dias após a indução, células F4/80+ do cérebro e medula foram isoladas e plaqueadas overnight. O sobrenadante foi coletado e a expressão caspase-1 foi analisada por W.B. **(B)** Quimeras de animais C57BL/6 recipientes para células de medula óssea de NLRP3<sup>-/-</sup> doadores (■) e vice-versa (□) foram desenvolvidas. 8 semanas após a transferência de células da medula óssea camundongos foram imunizados e EAE foi monitorada. (N= 4 animais por grupo). Dados são representativos de um em dois experimentos independentes e apresentados como médias +/- SEM. \* $p < 0.05$ , # $p < 0.001$ .

Juntos, esses resultados sugerem que a atividade do inflamassoma NLRP3 de forma específica no SNC possui papel relevante durante a EAE. Porém, qual tipo de célula residente está associado com esse processo ainda não podemos indicar a esse ponto. Como micróglia e astrócitos são as células residentes que estão envolvidas no desenvolvimento do processo inflamatório durante a patogênese da EAE, nós avaliamos o inflamassoma nesses tipos celulares nos experimentos subsequentes.

#### 4.18. Atividade de NLRP3 em micróglia após estímulo com ATP

Trabalhos prévios sugerem que micróglia pode apresentar ativação de NLRP3, uma vez que, por exemplo, em alguns modelos há secreção de IL-1 $\beta$  por estas células. Para confirmar se existe atividade do inflamassoma em micróglias, verificamos então a

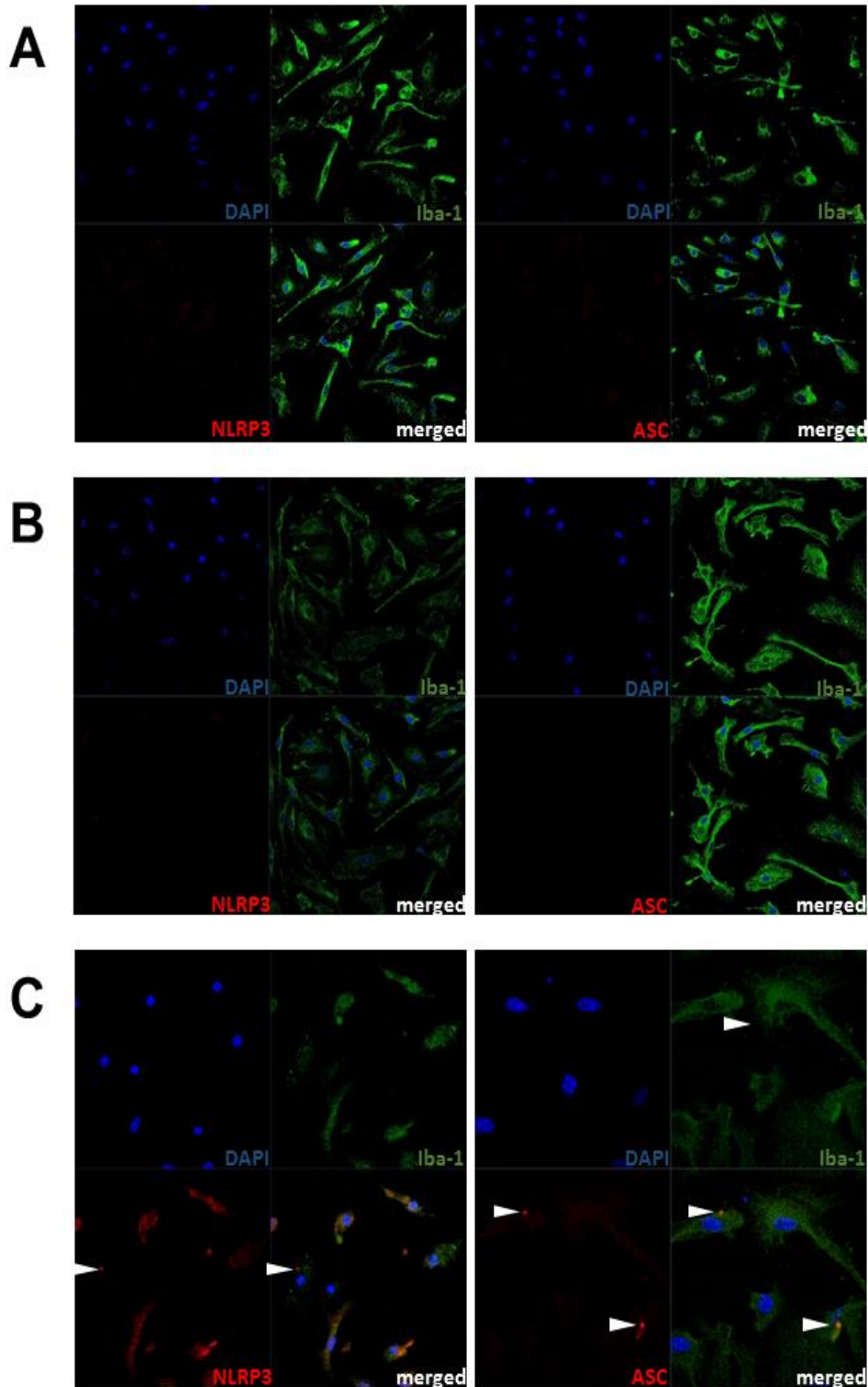
secreção de IL-1 $\beta$  e caspase-1 nos sobrenadantes de cultura de micróglia sob estimulação por ATP. De fato, após o estímulo por ATP é encontrado alto índice de secreção de IL-1 $\beta$  nos sobrenadantes (Figura 29 A), assim como é verificada a expressão da caspase-1 ativa nos mesmos sobrenadantes (Figura 29 B)



**Figura 29. Micróglia produz IL-1 $\beta$  e caspase-1 após estímulo com ATP.** Micróglia foram tratadas com LPS por 3 horas e estimuladas ou não com ATP por 30 minutos. O sobrenadante da cultura foi coletado e análise de **(A)** IL-1 $\beta$  por ELISA e **(B)** caspase-1 por W.B. foi realizada. Amostras de células não tratadas foram utilizadas como controle. Dados são representativos de um em três experimentos independentes e apresentados como médias  $\pm$  SEM. # $p < 0.001$

Além do mais, análise por microscopia confocal foi realizada para visualização dos *specks* em células estimuladas por ATP após tratamento com LPS. Como verificado na Figura 30, apenas o tratamento com LPS não resulta em formação do complexo nas micróglia (Figura 30 B). Porém, com ATP, o estímulo é suficiente para que estas células comecem a apresentar as partículas do complexo do inflamassoma NLRP3 (Figura 30 C). Amostras de células não tratadas foram utilizadas como controle negativo (Figura 30 A).

Juntos, esses resultados confirmam que micróglia possui a maquinaria do inflamassoma NLRP3 e esta é funcional nessas células após o tratamento com LPS seguido pela estimulação com ATP.

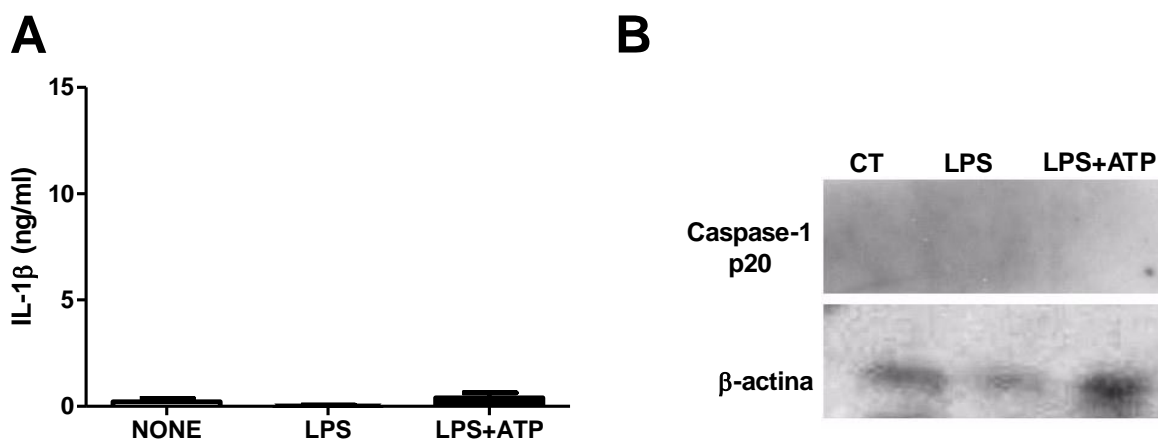


**Figura 30. O inflamassoma NLRP3 é ativado em micróglia após estímulo com ATP . (A)** Células não tratadas foram utilizadas como controle. **(B)** Micróglia foram tratadas com LPS por 3 horas. **(C)** Após tratamento com LPS, células foram estimuladas com ATP por 30 minutos. Microscopia confocal foi realizada e as células foram marcadas para o núcleo (DAPI), NLRP3 ou ASC e Iba-1. *Specks* são indicados pelas setas. Os dados são representativos de um em três experimentos independentes.

#### 4.19. De forma diferente de micróglia, astrócitos não apresentam ativação do inflamassoma após tratamento com ATP

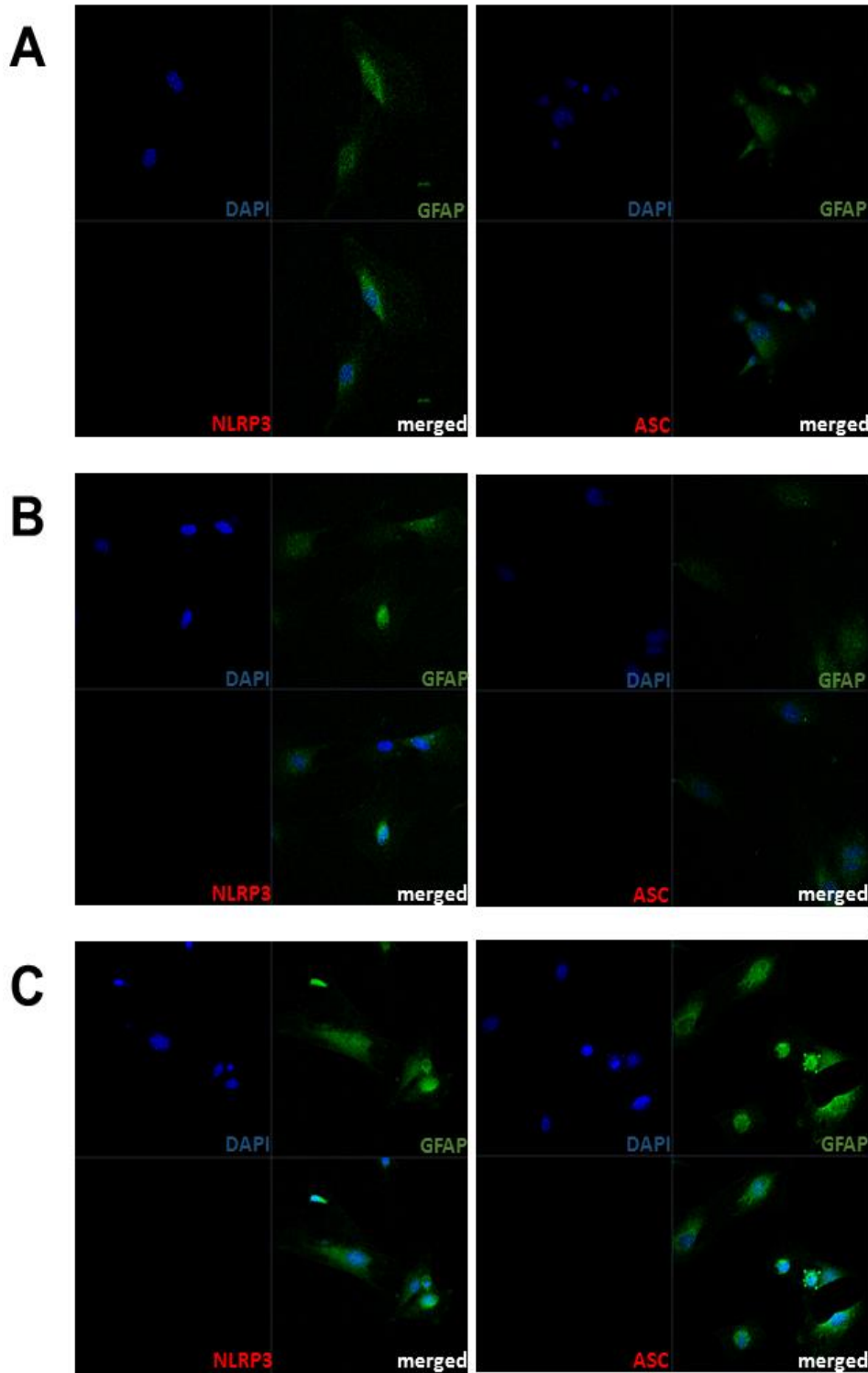
Em seguida, verificamos se os astrócitos também possuem NLRP3 funcional. Sob as mesmas condições das micróglia, eles foram estimulados por ATP após o tratamento com LPS e o sobrenadante foi utilizado para análise da secreção de IL-1 $\beta$  e caspase-1 clivada. Nós achamos que, ao contrário das células microgliais, os astrócitos não apresentam a secreção de IL-1 $\beta$  e ativação de caspase-1 (Figura 31 A e B, respectivamente) sob estímulo com o agonista do NLRP3.

Além do mais, análises por microscopia confocal de cultura de astrócitos sob a estimulação também não demonstrou a formação do complexo do inflamassoma mesmo após estímulo com ATP (Figura 32 A-C). Juntos, esses resultados sugerem que os astrócitos, diferentemente das micróglia, não possuem a maquinaria do inflamassoma NLRP3 funcional.



**Figura 31. Astrócitos não produzem IL- $\beta$  e caspase-1 após estímulo com ATP.** Astrócitos foram tratados com LPS por 3 horas e estimulados ou não com ATP por 30 minutos. O sobrenadante da cultura foi coletado e análise de **(A)** IL-1 $\beta$  por ELISA e **(B)** caspase-1 por W.B. foi realizada. Amostras de células não tratadas foram utilizadas como controle. Dados são representativos de um em três experimentos independentes e apresentados como médias  $\pm$  SEM.





**Figura 32. Astrócitos não expressam NLRP3 e ASC mesmo após estímulo com ATP. (A)** Células não tratadas foram utilizadas como controle. **(B)** Astrócitos foram tratados com LPS por 3 horas. **(C)** Após tratamento com LPS, células foram estimuladas com ATP por 30 minutos. Microscopia confocal foi realizada e as células foram marcadas para o núcleo (DAPI), NLRP3 ou ASC e GFAP. Os dados são representativos de um em três experimentos independentes

#### **4.20. Células de animais com EAE apresentando ativação de NLRP3 aparentemente interagem com micróglias em co-cultura**

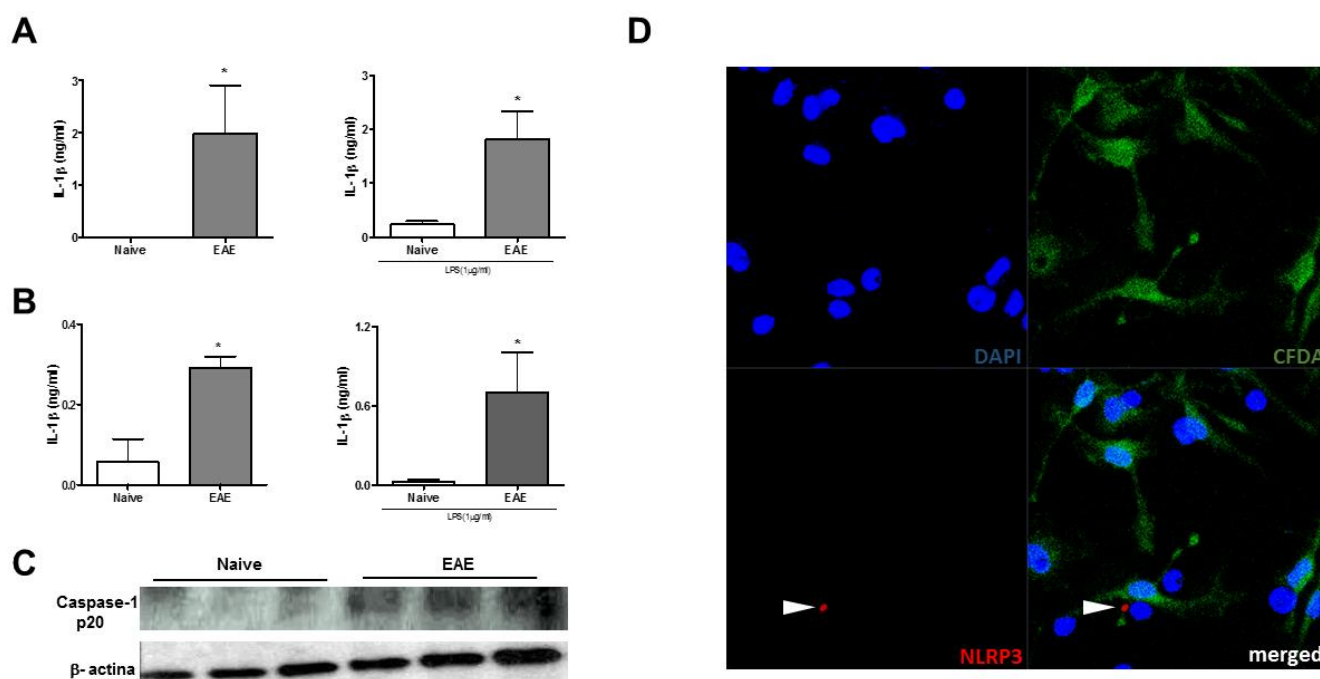
Uma vez que a ativação de inflamassomas é um mecanismo que amplifica o processo inflamatório da própria célula assim como células em interação, posteriormente, começamos a estudar se as células de animais com EAE ativadas na periferia após imunização apresentam ativação de NLRP3 e se estas células podem interagir com células da glia.

Primeiramente, antes dos experimentos de co-cultura, confirmamos se células do baço e linfonodos drenantes de animais na fase clínica inicial de EAE apresentam atividade do inflamassoma. Para isso, células F4/80+ foram isoladas dos tecidos mencionados de animais imunizados após 9 dias de indução, plaqueadas e tratadas ou não com LPS. Após incubação *overnight*, os sobrenadantes dessas células foram coletados para análise da secreção de IL-1 $\beta$  por ELISA. Tanto células do baço quanto as células dos linfonodos secretam IL-1 $\beta$  após a indução de EAE (Figura 33 A e B, respectivamente). O tratamento com LPS nas culturas amplificou de forma discreta a secreção da citocina (Figura 33 A e B). Também verificamos a liberação de caspase-1 ativada nos sobrenadantes da cultura de células do baço e a mesma tem sua expressão elevada nessas amostras (Figura 33 C). Esses dados indicam que o inflamassoma é ativado em células de órgãos linfóides periféricos na fase inicial da EAE.

Depois, nos perguntamos se essas células periféricas apresentando ativação de NLRP3 interagem de alguma forma com as células da glia. Com o intuito de discriminar as células provenientes dos animais daquelas da cultura de glia, antes da co-cultura as células gliais foram marcadas com CFDA. Com isso, todas as células marcadas em verde

são obrigatoriamente micróglia ou astrócitos e as outras não marcadas são células do baço/linfonodo dos animais. Como observado na figura representativa da microscopia confocal de co-cultura com micróglia (Figura 33 D), células periféricas de animais com EAE apresentando ativação do complexo de NLRP3 parecem interagir, de uma forma que ainda não podemos detalhar, com células da glia (Figura 33 D).

Juntos, esses resultados sugerem que, após indução da EAE, há ativação periférica do inflamassoma em células estimuladas e estas possivelmente interagem com as células da glia

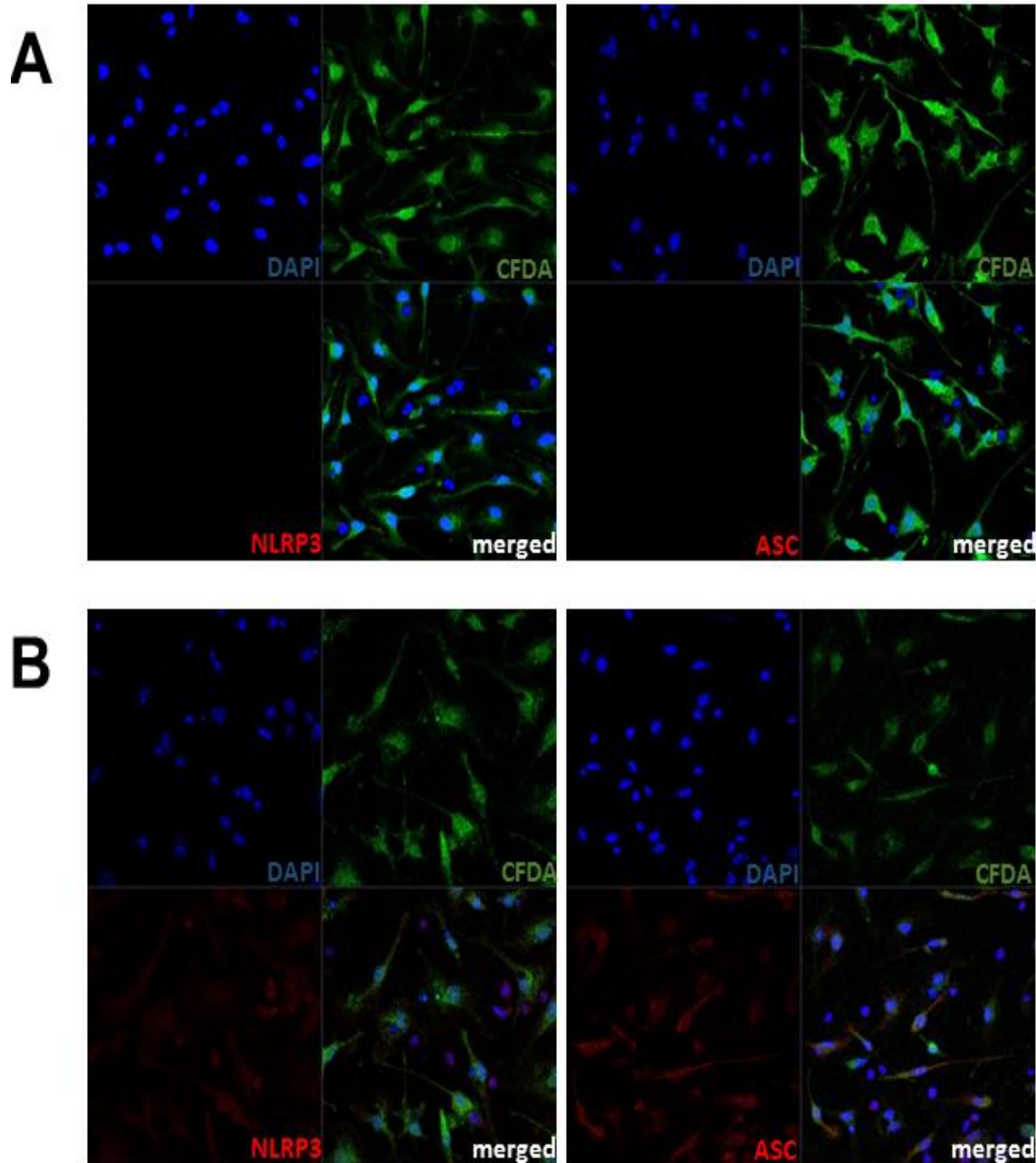


**Figura 33. Células dos órgãos linfóides periféricos de animais com EAE apresentam ativação de NLRP3 e aparentemente interagem com células da glia.** (A-C) Animais WT foram induzidos por MOG e 9 dias após a imunização, os mesmos foram sacrificados e baço e linfonodos drenantes foram retirados. Células F4/80+ foram então isoladas e cultivadas *overnight* na presença ou não de LPS. A produção de IL-1β no sobrenadante de cultura de células do baço (A) e linfonodos (B) foi analisada por ELISA. A secreção de caspase-1 foi verificada no sobrenadante de células do baço (C) por W.B. Paralelamente, células F4/80+ isoladas dos mesmos órgãos linfóides foram co-cultivadas por 1 hora com micróglia previamente coradas com CFDA. Marcação do núcleo (DAPI) e NLRP3 foi realizada e as amostras foram analisadas por microscopia confocal (D). *Speck* é indicado pela seta. Dados são representativos de um em três experimentos independentes e apresentados como médias +/- SEM. \*p < 0.05

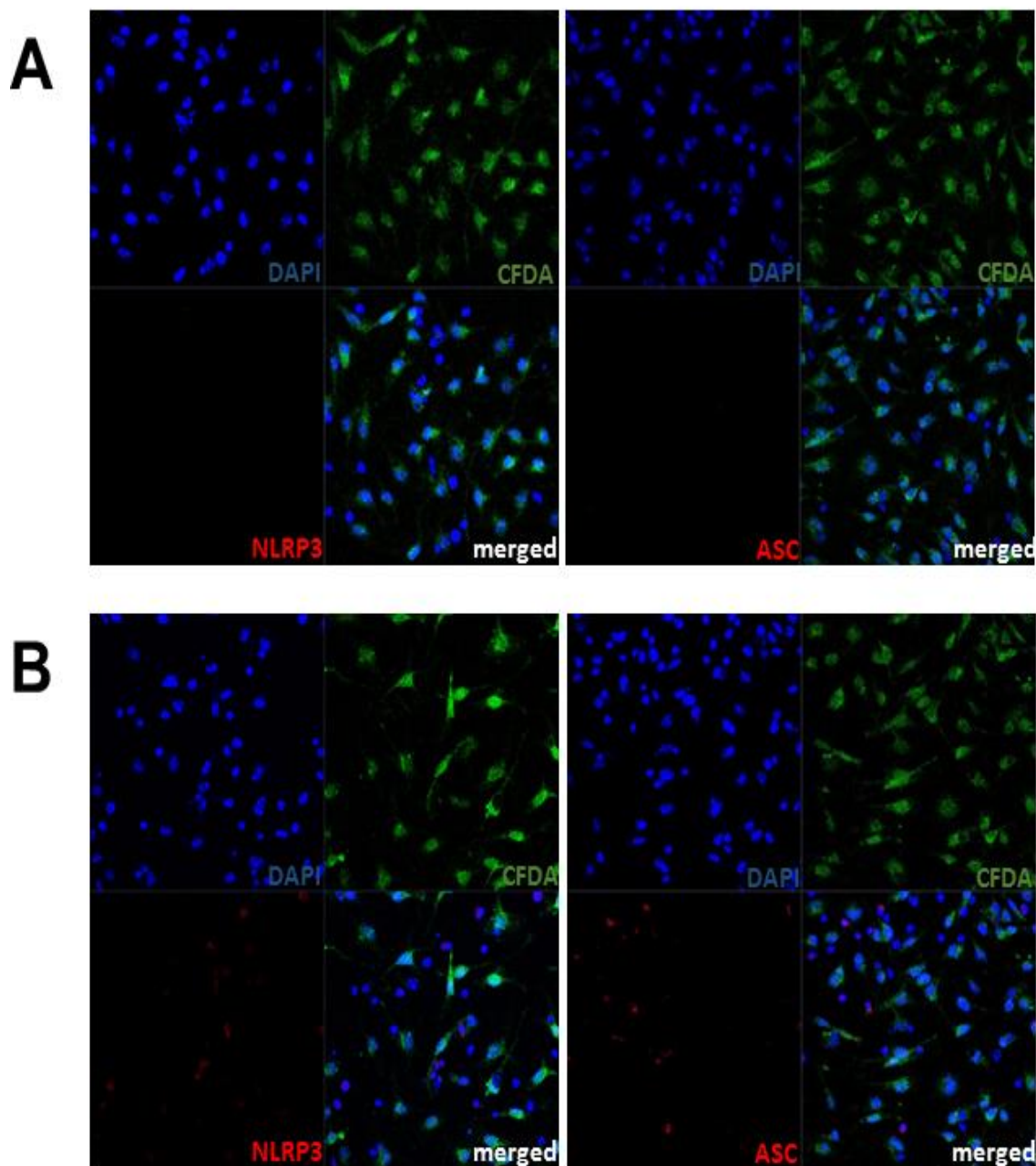
#### **4.21. Células de órgãos linfóides periféricos de animais imunizados induzem ativação de NLRP3 em micróglia**

Uma vez que células periféricas após indução de EAE podem interagir com células da glia, a próxima pergunta é se estas células podem, além de interagir, induzir a ativação do inflamassoma NLRP3 em células residentes do SNC em um ambiente inflamatório, como o observado na injúria do tecido nervoso durante EAE.

Primeiramente, realizamos experimentos de co-cultura com micróglia marcadas previamente com CFDA e células do baço e linfonodos drenantes provenientes de camundongos com 9 dias de indução, em diferentes razões e tempos de incubação. Nós não fomos capazes de encontrar os *specks* de inflamassoma em micróglia por microscopia confocal quando a cultura foi realizada com período de 1 hora de incubação, tanto na razão micróglia/células EAE de 1:2 quanto 1:3, como verificado nas Figuras 34 e 35, respectivamente. Células de animais naïve foram utilizadas em co-cultura controle com as micróglia (Figuras 34 A e 35 A). Apesar de aumentar a marcação intracelular tanto de NLRP3 quanto de ASC na cultura, não há a formação do complexo do inflamassoma nessas culturas (Figuras 34 B e 35 B).



**Figura 34. Uma hora de co-cultura com células de órgãos linfóides de camundongos com EAE não é suficiente para gerar formação de specks em micróglia.** Células F4/80+ foram isoladas do baço e linfonodos drenantes de camundongos naive (A) e induzidos por EAE (B) e co-cultivadas por uma hora com micróglia previamente coradas por CFDA a uma razão de 1 micróglia para cada 2 células periféricas. Marcação do núcleo (DAPI) e NLRP3 ou ASC foi realizada e as amostras foram analisadas por microscopia confocal. Os dados são representativos de um em três experimentos independentes.

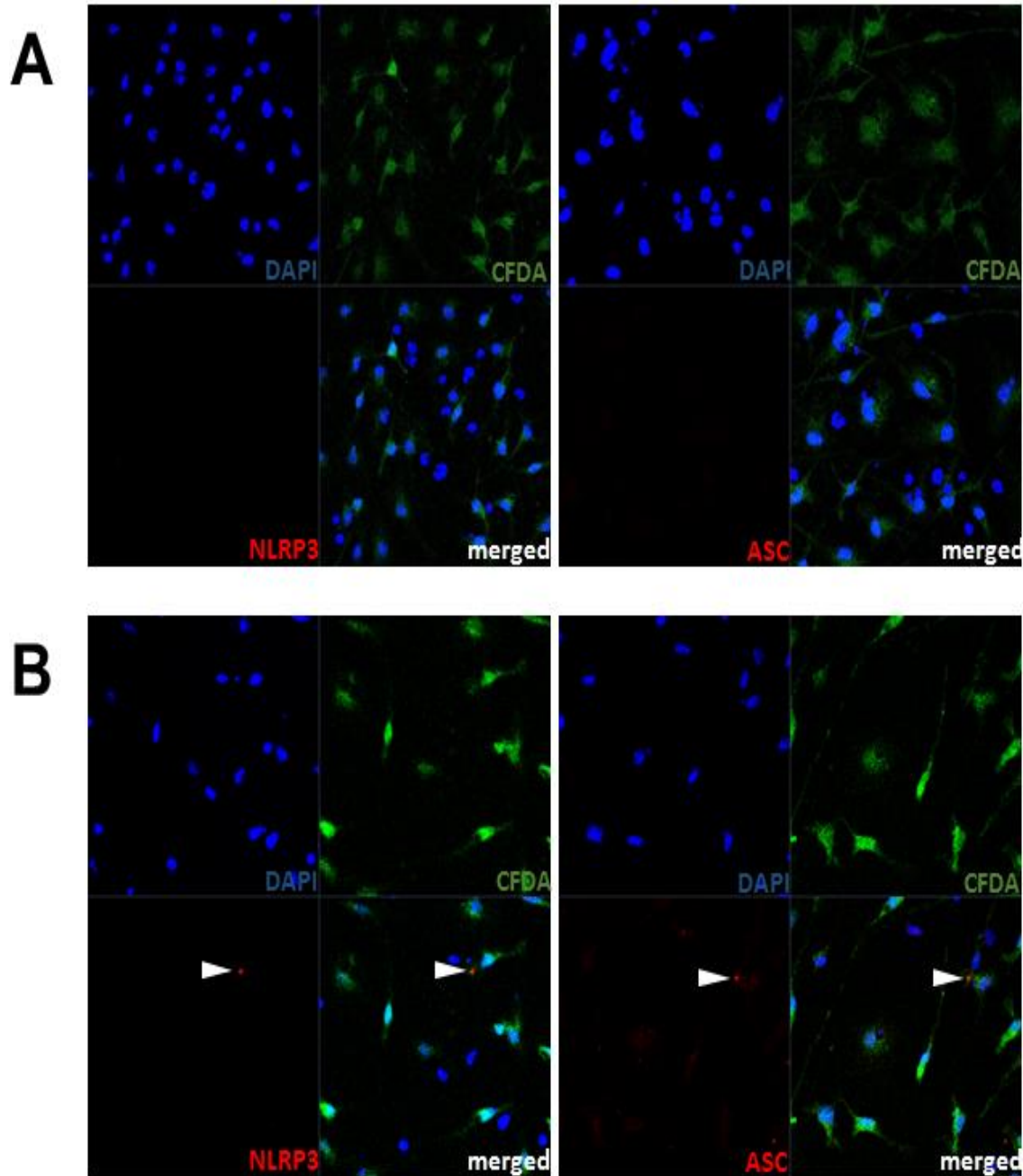


**Figura 35. Micróglias não apresentam formação dos *specks* de NLRP3 em uma hora de incubação mesmo em co-cultura com maior número de células de animais com EAE.** Células F4/80+ foram isoladas do baço e linfonodos drenantes de camundongos naïve (A) e induzidos por EAE (B) e co-cultivadas por uma hora com micróglias previamente coradas por CFDA a uma razão de 1 micróglia para cada 3 células periféricas. Marcação do núcleo (DAPI) e NLRP3 ou ASC foi realizada e as amostras foram analisadas por microscopia confocal. Os dados são representativos de um em três experimentos independentes.

Por outro lado, quando a co-cultura foi realizada com tempo de incubação maior, começamos a verificar a formação dos *specks* nas mesmas. Como podemos observar nas Figuras 36 e 37, sob diferentes razões celulares, 3 horas de co-cultura com células de animais EAE são suficientes para a montagem e subsequente ativação do inflamassoma NLRP3 especificamente nas micróglia. Células de animais naïve foram utilizadas em co-cultura controle com as micróglia (Figuras 36 A e 37 A). Através da marcação de NLRP3 e do adaptador ASC, observamos a existência dos *specks* microgliais em culturas com razões 1:2 e também 1:3 (Figura 36 B e 37 B, respectivamente).

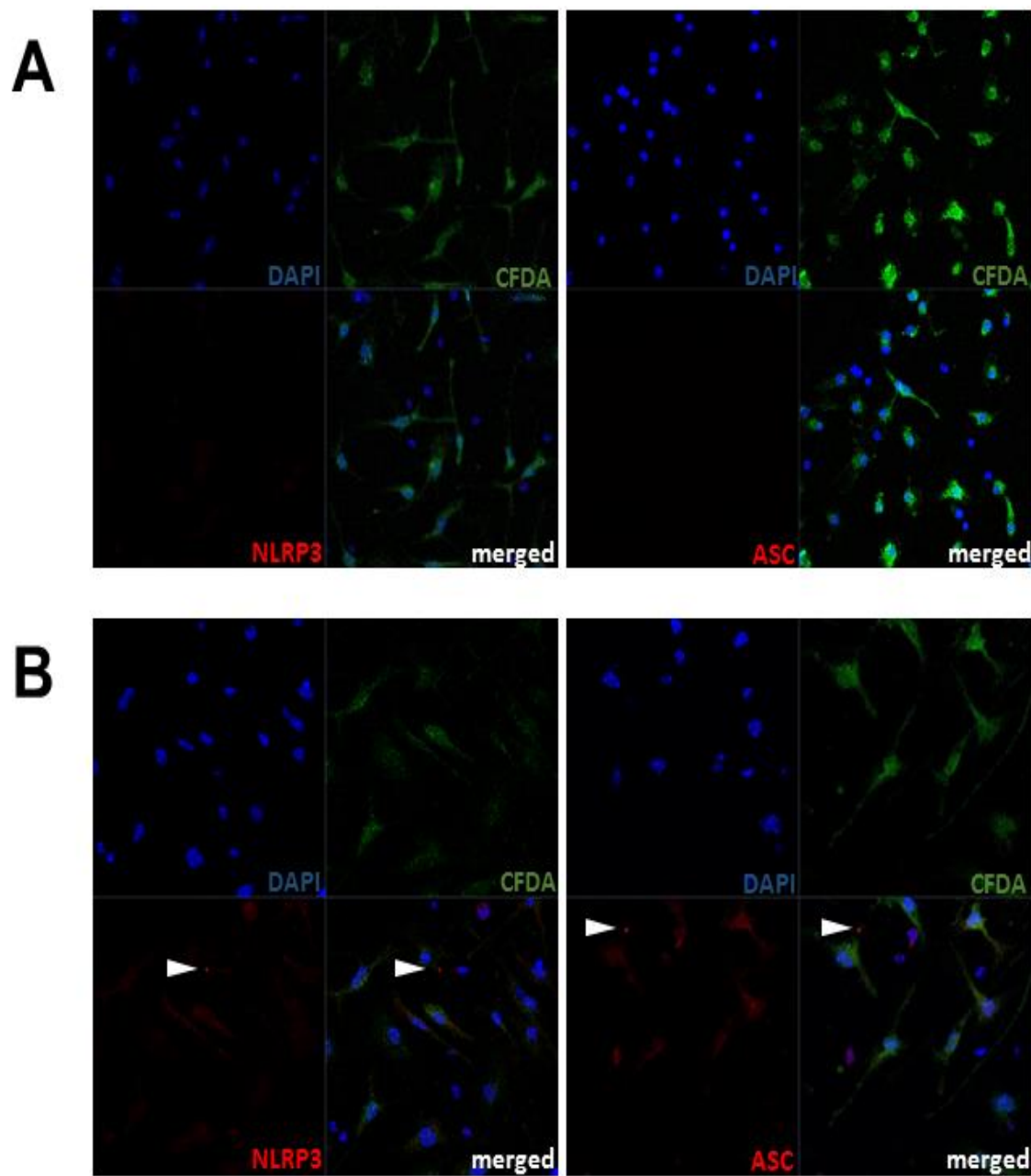
Juntos, esses resultados sugerem que, quando condicionada em um ambiente inflamatório através de co-cultura com células de órgãos linfóides periféricos estimuladas após indução de EAE, as micróglia têm a montagem da maquinaria e ativação do inflamassoma NLRP3, mecanismo esse que dura poucas horas até a ativação final do complexo.





**Figura 36.** Há montagem do complexo NLRP3 em micróglia após 3 horas de co-incubação com células periféricas de animais induzidos por EAE. Células F4/80+ foram isoladas do baço e linfonodos drenantes de camundongos naive (A) e induzidos por EAE (B) e co-cultivadas por três horas com micróglia previamente coradas por CFDA a uma razão de 1 micróglia para cada 2 células periféricas. Marcação do núcleo (DAPI) e NLRP3 ou ASC foi realizada e as amostras foram analisadas por microscopia confocal. Os *specks* são indicados pelas setas. Os dados são representativos de um em três experimentos independentes.

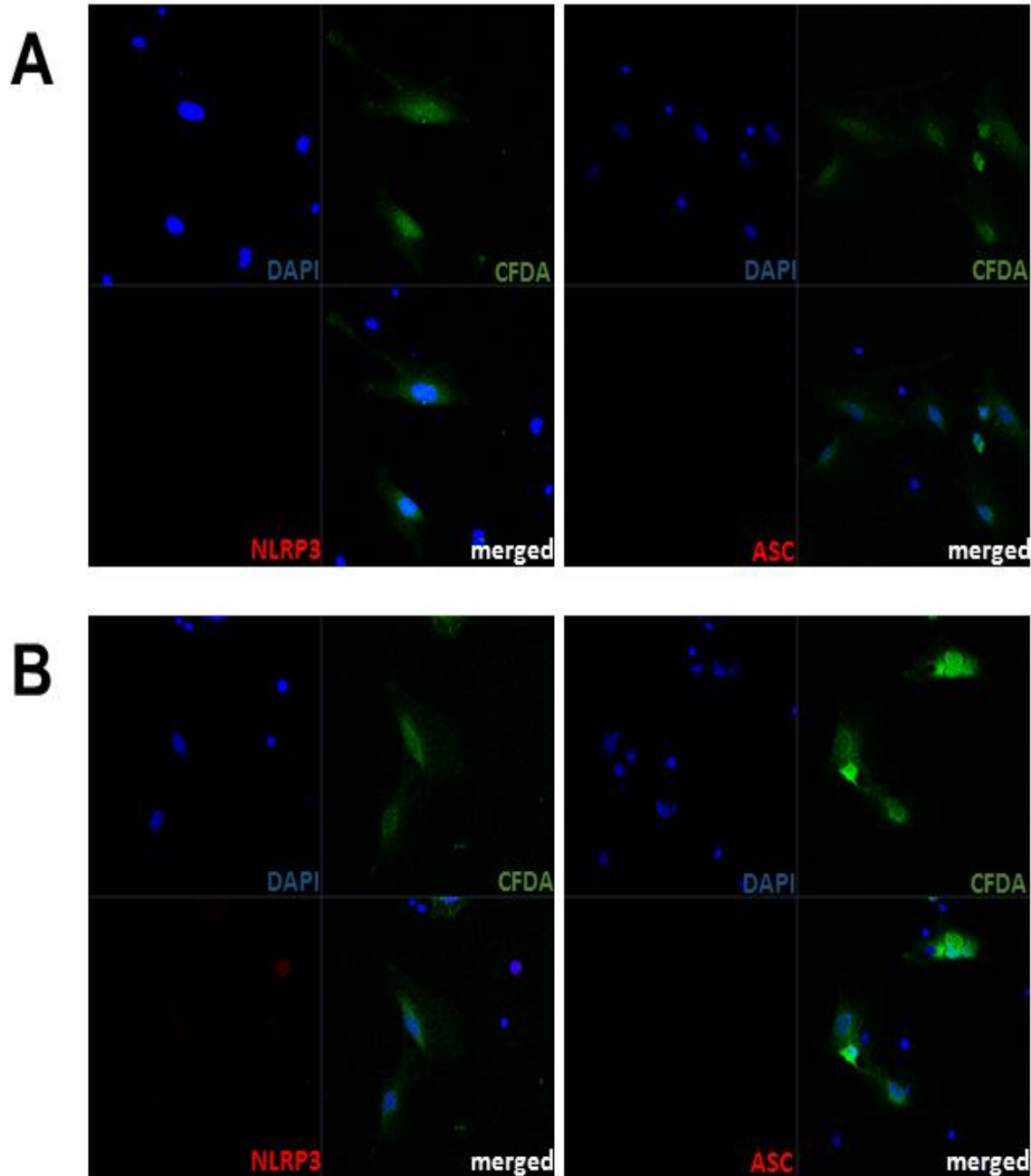




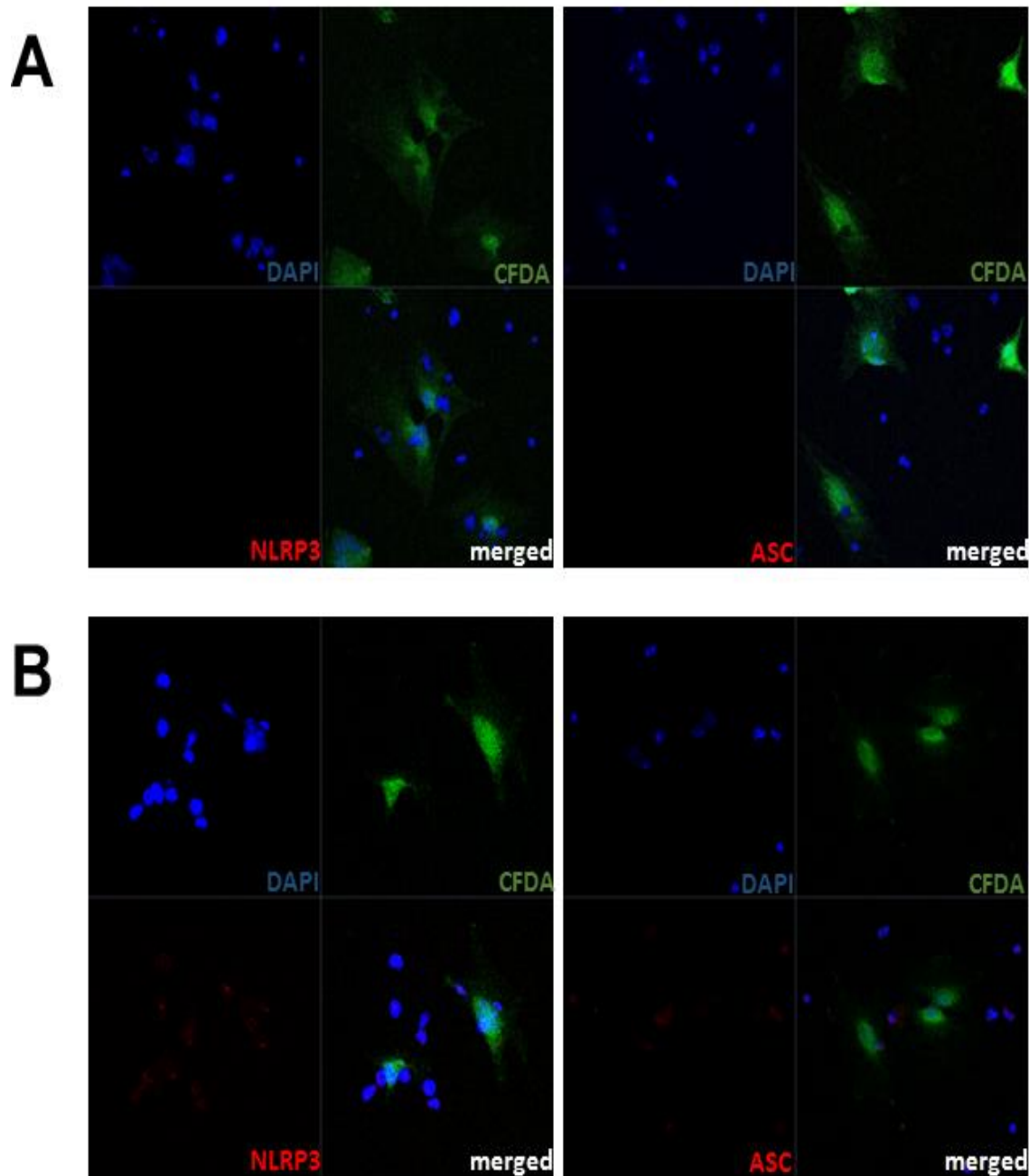
**Figura 37. NLRP3 também é ativado em micróglia após 3 horas de co-incubação com maior número de células periféricas de animais com EAE.** Células F4/80+ foram isoladas do baço e linfonodos drenantes de camundongos naive (A) e induzidos por EAE (B) e co-cultivadas por três horas com micróglia previamente coradas por CFDA a uma razão de 1 micróglia para cada 3 células periféricas. Marcação do núcleo (DAPI) e NLRP3 ou ASC foi realizada e as amostras foram analisadas por microscopia confocal. Os *specks* são indicados pelas setas. Os dados são representativos de um em três experimentos independentes.

#### **4.22. Astrócitos não apresentam ativação do inflamassoma NLRP3 em co-culturas com células de animais induzidos por EAE**

Uma vez que há ativação do complexo NLRP3 em micróglias após co-cultura com células de animais induzidos, nos perguntamos se isso pode também ocorrer nos astrócitos sob as mesmas condições. Para tal, realizamos experimentos de co-cultura com as mesmas proporções celulares e os mesmos períodos de tempo. Como podemos observar na Figura 38 e 39, assim como nas micróglias, não fomos capazes de encontrar a formação do complexo com apenas uma hora de incubação mútua das células. Porém, ao contrário das co-culturas com células microgliciais, a marcação de proteínas NLRP3 ou ASC só aparece nas células provenientes dos animais com EAE e não em astrócitos (Figuras 38 B e 39 B). Astrócitos com células de animais naïve foram co-cultivados como amostras controle (Figuras 38 A e 39 A).



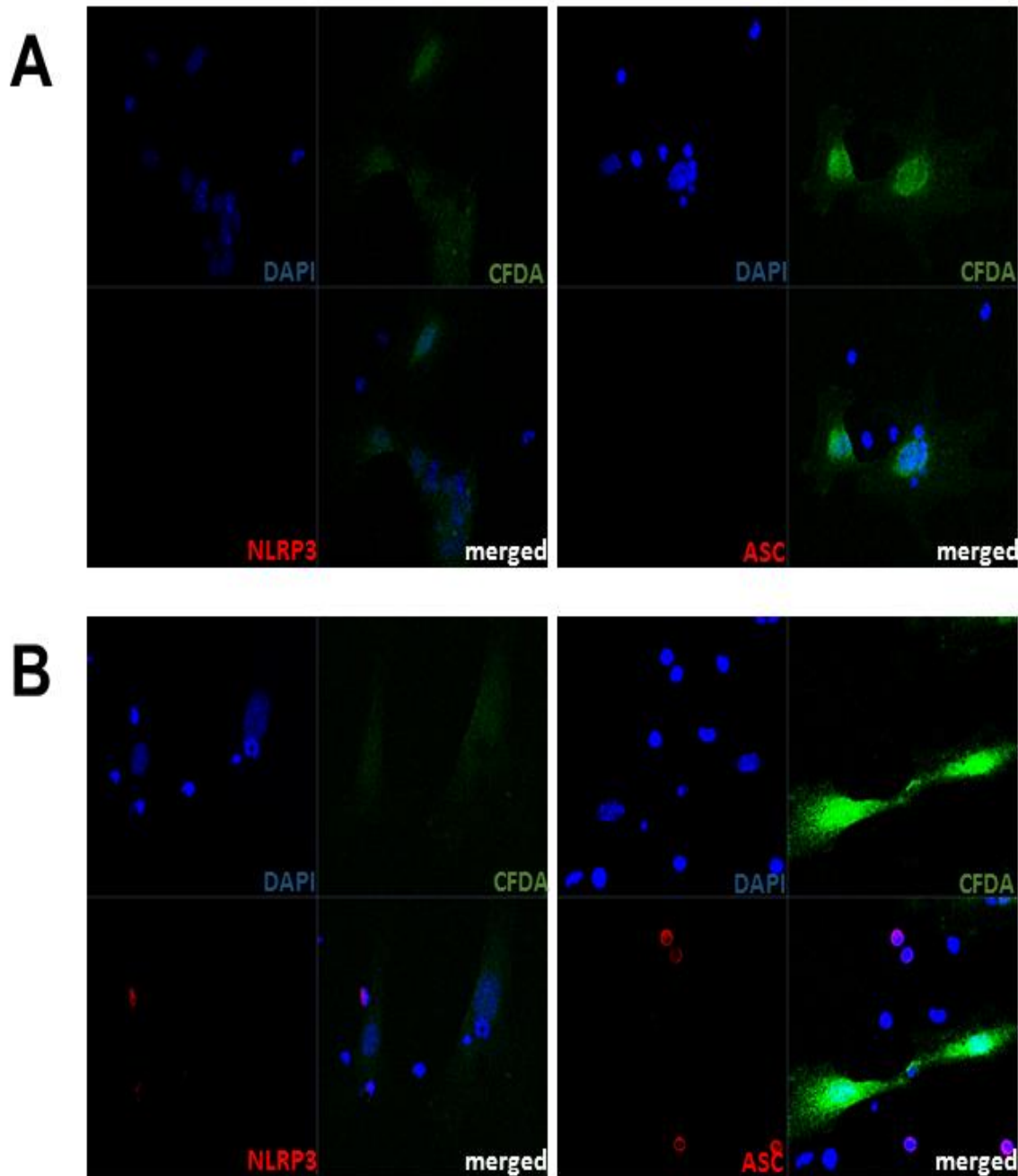
**Figura 38. Não há ativação do complexo NLRP3 em astrócitos após 1 horas de co-cultura com células provenientes de camundongos com EAE.** Células F4/80+ foram isoladas do baço e linfonodos drenantes de camundongos naive (A) e induzidos por EAE (B) e co-cultivadas por uma hora com astrócitos previamente corados por CFDA a uma razão de 1 astrócito para cada 2 células periféricas. Marcação do núcleo (DAPI) e NLRP3 ou ASC foi realizada e as amostras foram analisadas por microscopia confocal. Os dados são representativos de um em três experimentos independentes.



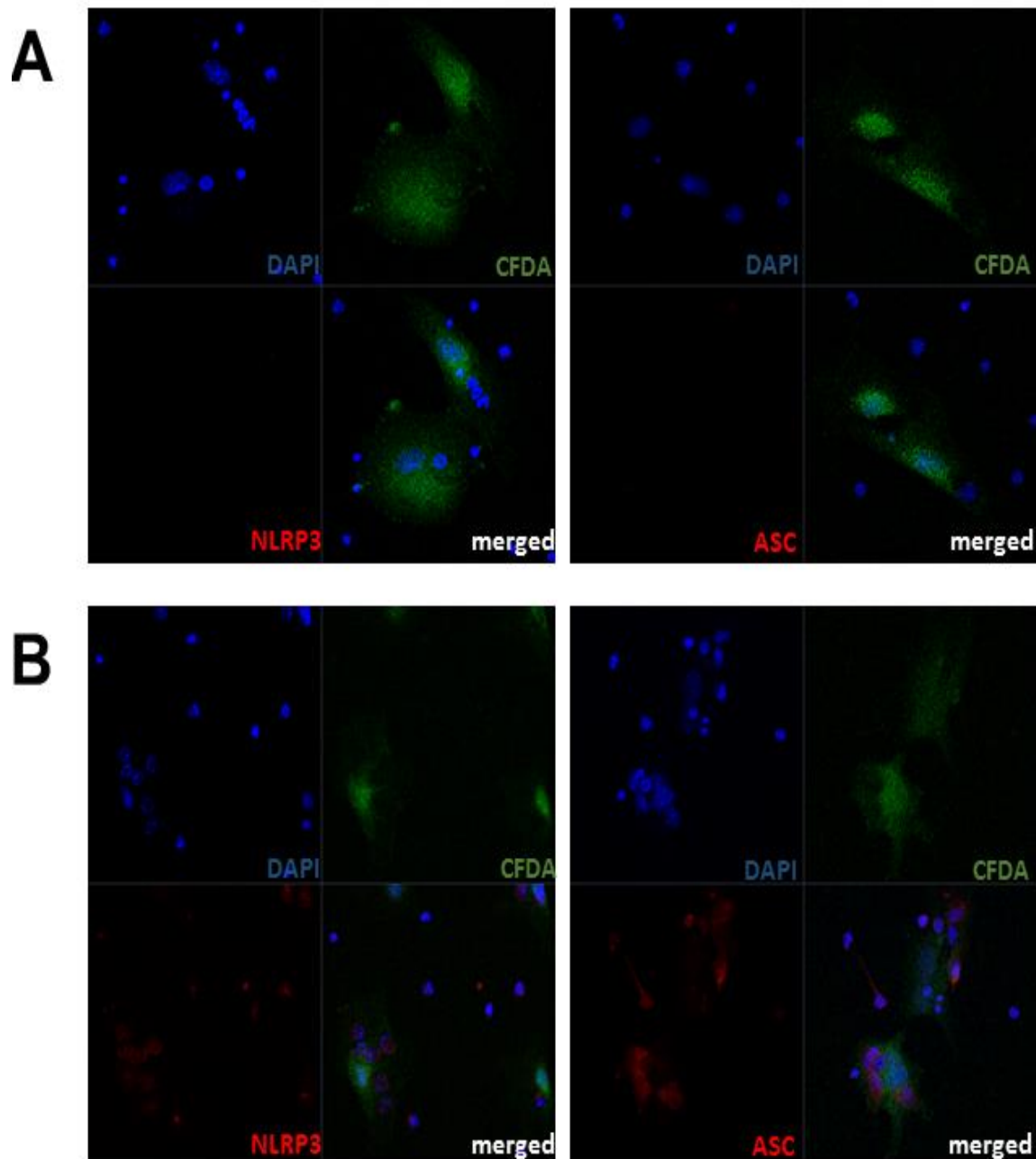
**Figura 39. Astrócitos não apresentam expressão/ativação de NLRP3 mesmo durante co-cultura por 1 hora com maior número de células de animais com EAE.** Células F4/80+ foram isoladas do baço e linfonodos drenantes de camundongos naive (A) e induzidos por EAE (B) e co-cultivadas por uma hora com astrócitos previamente corados por CFDA a uma razão de 1 astrócito para cada 3 células periféricas. Marcação do núcleo (DAPI) e NLRP3 ou ASC foi realizada e as amostras foram analisadas por microscopia confocal. Os dados são representativos de um em três experimentos independentes.

Prosseguindo, realizamos a co-cultura com 3 horas de incubação, tempo suficiente para acharmos a formação de *specks*, como foi encontrado em células em micróglia nos experimentos anteriores. Porém, diferentemente de micróglia, os astrócitos não apresentam a formação do complexo proteico mesmo após 3 horas de co-incubação com células de órgãos linfóides periféricos de animais imunizados (Figuras 40 e 41). Continuamos a verificar a marcação tanto de NLRP3 quanto de ASC em células linfóides, mas não nos astrócitos (Figuras 40 B e 41 B).

Juntos, esses resultados de co-cultura e os iniciais utilizando-se da estimulação com ATP após tratamento com LPS indicam que, células de órgãos linfóides periféricos de animais com EAE não possuem a capacidade de induzir a ativação do inflamassoma NLRP3 em astrócitos *in vitro*, devido à ausência da maquinaria funcional do complexo nas mesmas.



**Figura 40. Não ocorre ativação do inflamassoma NLRP3 em astrócitos em co-cultura por 3 horas com células isoladas de animais com EAE.** Células F4/80+ foram isoladas do baço e linfonodos drenantes de camundongos naive (A) e induzidos por EAE (B) e co-cultivadas por três horas com astrócitos previamente corados por CFDA a uma razão de 1 astrócito para cada 2 células periféricas. Marcação do núcleo (DAPI) e NLRP3 ou ASC foi realizada e as amostras foram analisadas por microscopia confocal. Os dados são representativos de um em três experimentos independentes.



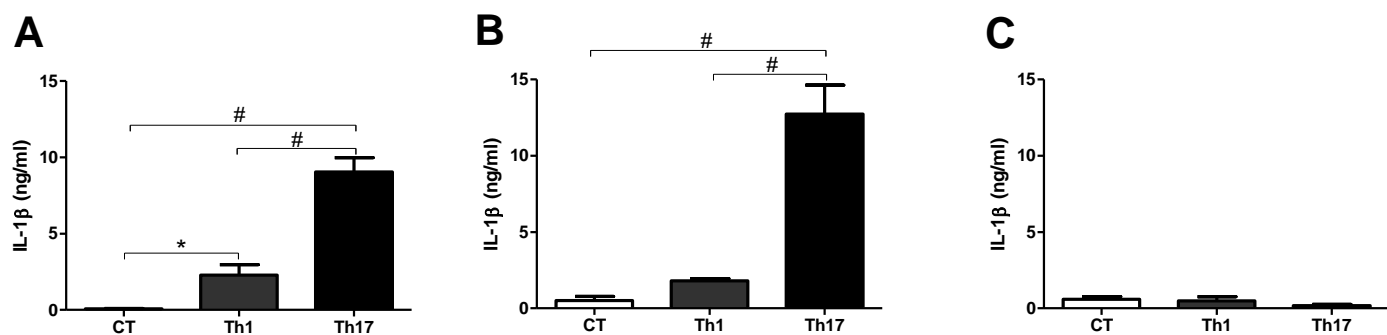
**Figura 41. Astrócitos não apresentam expressão/ativação de NLRP3 mesmo em co-cultura com maior número de células provenientes de animais imunizados.** Células F4/80+ foram isoladas do baço e linfonodos drenantes de camundongos naive (A) e induzidos por EAE (B) e co-cultivadas por três horas com astrócitos previamente corados por CFDA a uma razão de 1 astrócito para cada 3 células periféricas. Marcação do núcleo (DAPI) e NLRP3 ou ASC foi realizada e as amostras foram analisadas por microscopia confocal. Os dados são representativos de um em três experimentos independentes.

#### **4.23. A presença de linfócitos Th17 na presença de MOG induz maior secreção de IL-1 $\beta$ por micróglia**

O ambiente inflamatório resultante da ação local de células infiltrantes e seus fatores liberados estimula células da glia durante EAE. Diante disso, perguntamos se o ambiente de cultura com linfócitos Th1 ou Th17 na presença do peptídeo MOG pode estimular a ativação do inflamassoma nas células da glia. Após polarização de células T naíve de animais transgênicos T2D2 para células Th1 ou Th17 na presença do peptídeo de mielina, adicionamos micróglia ou astrócitos na cultura com essas células e MOG, mantendo em incubação por 24 horas. Após esse período, o sobrenadante foi retirado para análise de IL-1 $\beta$  por ELISA. Uma vez que células BMDM são protótipos de ativação do inflamassoma, utilizamos essas células como um parâmetro comparativo. Como podemos observar na Figura 42 A, BMDM liberam níveis significativamente aumentados de IL-1 $\beta$  após co-cultura com células Th1 e Th17, sendo as últimas induzindo níveis maiores da citocina pelas BMDM (Figura 42 A). Aparentemente, esse perfil também foi encontrado em micróglia, porém não houve diferença significativa para a co-cultura com linfócitos Th1 (Figura 42 B). A co-cultura das células microgliais com linfócitos Th17 na presença de MOG resulta em elevados níveis de IL-1 $\beta$  (Figura 42 B). Em relação aos astrócitos, a co-cultura com ambos fenótipos de células T na presença de MOG não resultou em produção de IL-1 $\beta$  no sobrenadante (Figura 42 C), o que está de acordo com todos os experimentos anteriores em relação à funcionalidade de NLRP3 nesse tipo celular.



Juntos, esses dados sugerem que no ambiente inflamatório, linfócitos Th17 e seus fatores liberados podem ser um mecanismo indutor mais eficiente de ativação do inflamassoma NLRP3 em micróglias.



**Figura 42. Ambiente com a presença de linfócitos Th17 e MOG induz maior produção de IL-1β por BMDM e micróglias.** BMDM (A), micróglias (B) e astrócitos (C) foram co-cultivados com linfócitos T isolados de camundongos transgênicos 2D2 e diferenciados para Th1 ou Th17 na presença de MOG por 24 horas. Os sobrenadantes foram então recolhidos e análise de IL-1β foi realizada por ELISA. Dados são representativos de um em três experimentos independentes e apresentados como médias +/- SEM. #p <0.001

## 5. Discussão

Neste estudo foi demonstrado que SOCS2 possui papel duplo durante o desenvolvimento de EAE. Na primeira fase, a qual definimos como a fase inicial dos sinais clínicos (aproximadamente 11 dpi) até a fase de pico inflamatório (14 dpi) a proteína exerce um papel na piora da severidade da doença. O estudo com os animais deficientes para SOCS2 mostrou que os mesmos apresentam início com severidade significativamente reduzida e o pico da doença é atrasado. Além do mais, em animais WT doentes, SOCS2 tem sua expressão aumentada no SNC o que reforça o papel dessa molécula durante a doença. Também, estudos com animais nocautes indicaram que expressão de SOCS2 é associada com o nível de expressão de 5-LO/AhR, sugerindo que a via 5-LO/AhR poderia estar ativada durante a EAE. Outro ponto importante é a possibilidade de uma via alternativa "feedback" (SOCS2/5-LO/AhR), onde SOCS2 não seria apenas induzido pela ativação de 5-LO/AhR, mas sim estaria atuando como um "feedback" positivo para a ativação da enzima/receptor. A redução da severidade em animais SOCS2<sup>-/-</sup> está associada com a redução do infiltrado de células T autorreativas bem como nos níveis de inflamação do SNC destes animais. Por outro lado, na segunda fase da doença, definida aqui como a fase de remissão dos sinais clínicos observada logo após o pico inflamatório de EAE, SOCS2 possui papel inverso da primeira fase. Nesse período, a proteína está relacionada com a recuperação dos animais WT. Camundongos SOCS2<sup>-/-</sup> não conseguem recuperar-se dos danos provocados pela doença e isso está associado com acúmulo de células inflamatórias e subsequente aumento de inflamação no SNC.

Uma vez que é conhecido que a fase de apresentação dos sintomas inicia-se em torno de 11 dpi e o pico da doença nos animais C57 BL/6 induzida sob protocolo similar é em torno de 14-16 dias pós-indução (Inoue, Williams *et al.* 2012; Quintana, Basso *et al.* 2008; Rodrigues, Lacerda-Queiroz *et al.* 2011), isto foi corroborado em todos nossos experimentos. Definimos também que o fim da avaliação poderia ser aos 28 dias após a imunização, uma vez que os animais do tipo selvagem não alteram mais seu perfil clínico a partir desse ponto.

Evento crucial na EAE é a chegada maciça de células T (as quais foram estimuladas na periferia) ao SNC. Esse evento correlaciona-se com a patogênese dos surtos da esclerose múltipla pois esses mecanismos são similares em ambos processos. Além do mais, as principais estratégias de tratamento contra a doença humana, incluindo aquelas utilizando drogas de primeira escolha como o IFN- $\beta$ , por exemplo, visam a diminuição desses eventos a fim de evitar ou reduzir as consequências devastadoras do processo inflamatório no tecido nervoso durante esses relapsos (Yong, Chabot *et al.* 1998; Rudick e Sandrock 2004). Nesse sentido, nossos estudos indicam, pela primeira vez, o envolvimento de SOCS2 como uma nova molécula associada a patogênese, pois como abordado anteriormente, a proteína tem sua expressão aumentada durante o pico da doença e os animais SOCS2<sup>-/-</sup> apresentam severidade de uma forma significativamente diminuída.

Linfócitos T com perfil de resposta Th1 e Th17, secretando IFN- $\gamma$  e IL-17 respectivamente, são os componentes centrais no estabelecimento dos danos no SNC. Isso é corroborado em estudos com animais deficientes de fatores de transcrição envolvidos na diferenciação dessas células (Ivanov, McKenzie *et al.* 2006; Korn, Reddy

*et al.* 2007). De acordo com nossos resultados, SOCS2 promove/regula a chegada dessas células ao SNC, resultando em inflamação nesse sítio.

A redução do processo inflamatório encontrada em animais nocautes com EAE está de acordo com outros trabalhos do laboratório. O grupo tem sido pioneiro nos estudos os quais indicam papel de SOCS2 em infecções parasitárias. Neste contexto, a função que a proteína exerce nos diferentes modelos é muito complexa e variável. Por exemplo, após infecção por *Toxoplasma gondii*, camundongos deficientes apresentaram proliferação reduzida do parasita, porém com produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias, maior infiltrado leucocitário no SNC e mortalidade aumentada (Machado, Johndrow *et al.* 2005) . Após a infecção de células dendríticas pelo *T. gondii*, ocorre o aumento da expressão de SOCS2 o qual é induzido pela Lipoxina A4 (LXA4), um produto liberado pela enzima 5-Lipoxigenase (5-LO) durante processo inflamatório. Por outro lado, no modelo experimental de Doença de Chagas aguda, a deficiência da molécula resultou em diminuição da parasitemia e da produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  bem como na expressão de outros membros da família SOCS, como SOCS1 e 3 tanto no baço quanto no coração (Esper, Roman-Campos *et al.* 2012). Além do mais, nos animais deficientes houve um aumento da produção de LXA4 assim como maior geração e expansão de células Treg após a infecção. Por outro lado, animais SOCS2<sup>-/-</sup> apresentaram maior disfunção cardíaca associada com a infecção pelo *Trypanosoma cruzi* (Esper, Roman-Campos *et al.* 2012). Essas abordagens refletem a complexidade da atuação de SOCS2 nos diferentes modelos experimentais.

Nós observamos que camundongos SOCS2<sup>-/-</sup> apresentam reduzido nível de CCL-5 no SNC durante o início da doença. Esta quimiocina recruta os linfócitos T autorreativos diretamente para o tecido nervoso, amplificando a população dessas células. Com isso, podemos fazer a correlação da sua redução com o menor infiltrado celular nos animais nocautes durante o pico da doença. A produção esplênica de células Th17 no pico da doença é reduzida nos animais nocautes, mas não houve diferença significativa para Th1. Por outro lado, verificamos redução na população tanto de células Th1 quanto de Th17 no baço dos animais nocautes em 11 dpi. Esses resultados sugerem que o menor infiltrado de células autorreativas no SNC na fase inicial da doença pode ser devido, além da redução de quimiocina, também pela redução na geração/expansão dessas células. Outro fator importante é que SOCS2 possui papel na regulação negativa do perfil Th2. Knosp *et al* demonstraram que SOCS2 regula negativamente o comprometimento do perfil de resposta Th2. Células T CD4 naïve deficientes de SOCS2 aumentam significativamente a sua diferenciação para Th2 e após a ativação destas células ocorre maior fosforilação de STAT 5 e 6 e, por outro lado, diminuição dos níveis de STAT3 fosforilada (Knosp, Carroll *et al.* 2011). Neste estudo, os autores demonstraram que SOCS2 é importante em regular a polarização de resposta Th2 nos modelos de alergia e asma (Knosp, Carroll *et al.* 2011). Nesse sentido, a diferenciação de células indiferenciadas naïve para o perfil Th2 pode estar sendo exacerbada nos animais SOCS2<sup>-/-</sup> durante as fases iniciais da EAE, o que dificultaria consequentemente a polarização de células Th1 e Th17 no início da doença. Isso poderia abrir uma janela inicial de inibição destas células efetoras. Posteriormente, devido a estimulação antigênica exercida pelos fatores indutores utilizados no modelo, essa deficiência na

geração/expansão de Th1 e Th17 poderia ser revertida e esses fenótipos sobressaindo sobre outros. De fato, observamos mudanças da população esplênica de células inflamatórias desde os estágios clínicos anteriores ao pico da doença, sugerindo uma deficiência na geração periférica precoce destas células pelos animais nocautes.

De forma concomitante com a redução de células T efetoras no SNC de animais nocautes, encontramos reduzido número de células Treg FoxP3+. Já foi previamente demonstrada a associação de CCR6 não só com o aumento de células Th1, mas também de T reguladoras, ao mesmo tempo, no SNC durante a fase aguda da EAE (Villares, Cadenas *et al.* 2009). Estas Tregs recrutadas via CCR6 para o tecido inflamado são expandidas através das ações das células TCD4+ efetoras produzindo IL-2 diretamente sobre o receptor CD25 (subunidade IL-2R $\alpha$ ) que está expresso nas células Tregs (Almeida, Zaragoza *et al.* 2006). SOCS2 poderia influenciar também esse mecanismo, o que explicaria a redução concomitante de Tregs e células efetoras durante a fase aguda de EAE observada em nossos resultados. Porém, mais estudos serão necessários para confirmarmos essa hipótese.

Demonstramos que SOCS2 atua na regulação de IRF-1 no modelo proposto. IRF-1 pode ser induzido por vírus, ácido retinóico, IL-2, IL-6, entre outras moléculas, e tem sido descrito como um regulador positivo essencial na sinalização do IFN- $\gamma$ , bem como indutor da diferenciação de células Th1 (Lohoff e Mak 2005). Há diversos trabalhos que descrevem IRF-1 como uma molécula importante no desenvolvimento de EAE (Tada, Ho *et al.* 1997; Ren, Wang *et al.* 2010; Ren, Wang *et al.* 2011; Loda e Balabanov 2012). Camundongos deficientes de IRF-1 apresentam incidência e severidade reduzidas de EAE, assim como modelo experimental de artrite (Tada, Ho *et al.* 1997). A expressão de

IRF-1 no SNC é um fator crucial para o desenvolvimento da doença nos animais. O grupo de Ren demonstrou que, após indução de EAE, IRF-1 induz a desmielinização no tecido nervoso dos animais, e regula positivamente a piroptose, um processo de morte celular dependente da expressão de Caspase-1 (Ren, Wang *et al.* 2010; Ren, Wang *et al.* 2011; Loda e Balabanov 2012). Além do mais, a regulação positiva da Caspase-1 em células da glia foi verificada não somente no modelo de EAE, mas também em amostras de cérebro de pacientes com EM (Ren, Wang *et al.* 2011). Nossos dados mostram que a deficiência de SOCS2 resulta em inibição da expressão de IRF-1 no SNC dos animais. Não podemos afirmar que a proteína SOCS2 atua diretamente na regulação de IRF-1 ou se a inibição deste fator regulatório é um resultado secundário à diminuição dos níveis de IFN- $\gamma$  observados nos animais nocautes. Entretanto, a diminuição dos níveis basais observados nos animais SOCS2<sup>-/-</sup> controle em relação às suas contrapartes WT nos sugere um papel mais importante da proteína na sinalização de IRF-1. De qualquer forma, a inibição de IRF-1 no SNC na ausência de SOCS2 provavelmente é um mecanismo importante para a diminuição da desmielinização na fase de estabelecimento clínico da EAE.

Relatos na literatura demonstram que a expressão de SOCS2 pode ser influenciada por diferentes vias de sinalização, entre elas a via do ácido araquidônico, o qual pode ser processado pela enzima 5-LO, gerando mediadores como as LXA4 que são capazes de se ligar ao receptor AhR e através deste regular a expressão de genes SOCS2 (Gasiewicz, Henry *et al.* 2008; McBerry, Gonzalez *et al.* 2012). Além do mais, a regulação da expressão de SOCS2 em células dendríticas é correlacionada tanto com a expressão de 5-LO quanto do receptor AhR (Machado, Johndrow *et al.* 2006). Como

discutido anteriormente, observamos no nosso estudo que animais deficientes de SOCS2 possuem expressão reduzida de 5-LO bem como de AhR. Veldhoen e colaboradores demonstraram que AhR modula a diferenciação de células Th17 e, dependendo do ligante, pode influenciar de forma diferente na doença. Neste estudo, a ativação de AhR pela ligação de FICZ (*6-formylindolo[3,2-b]carbazole*) induz acelerada fase inicial e aumento da patologia nos animais. Por outro lado, a administração de forma sistemática de TCDD (*2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin*), um outro ligante para AhR, resulta em melhora na severidade da doença nos animais WT ao nível dos animais deficientes de AhR, sugerindo que esse receptor tem atividade dualística sobre a doença, de uma maneira dependente do ligante (Veldhoen, Hirota *et al.* 2008). Além do mais, Quintana e colaboradores demonstraram que, usando o agonista TCDD, AhR estimula a diferenciação de células Treg tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Quintana, Basso *et al.* 2008), o que seria benéfico para animais com EAE. De fato, este receptor é altamente promíscuo, possuindo uma série de ligantes diferentes, o que aumenta a complexidade de entendimento sobre sua atividade nos diferentes modelos, inclusive na EAE. Isso pode ser um aspecto dificultador no sentido do desenvolvimento de terapias, uma vez que AhR, além de possuir diversos ligantes, é importante em uma série de mecanismos fisiológicos normais, como crescimento e desenvolvimento hepático, estrutura de vasos capilares, fertilidade, regulação imune, entre outros (Schmidt, Su *et al.* 1996; Hao e Whitelaw 2013). Em contrapartida, estudos objetivando o envolvimento de 5-LO na EAE ou EM são raros. Há apenas alguns poucos trabalhos na literatura indicando a participação da enzima, sendo que nenhum apresentando detalhes de possíveis aspectos imunológicos. Por exemplo, utilizando-se da técnica de microarranjo de DNA, Whitney *et al* demonstraram



a expressão de 5-LO em lesões no cérebro de pacientes com esclerose múltipla e em camundongos com EAE (Whitney, Ludwin *et al.* 2001). Em outro estudo, camundongos deficientes de 5-LO apresentam significativo aumento de severidade da doença, quando comparado com os seus controles 129S1/SvImJ (Emerson e LeVine 2004).

Nós verificamos que, de forma semelhante aos animais deficientes de SOCS2, camundongos AhR<sup>-/-</sup> são resistentes a EAE na fase inicial, o que indica um papel relevante para ambas as moléculas. Porém, na fase de resolução da doença a deficiência de AhR continua sendo benéfica para os animais, o que não acontece com SOCS2. Como já abordado, o receptor está envolvido em diversas vias de sinalização e provavelmente não regula apenas a expressão de SOCS2 durante a EAE. Isso poderia ser uma explicação para o efeito oposto entre as duas moléculas na fase tardia da doença. Outras moléculas reguladas por AhR, como por exemplo TGF- $\beta$ , podem atuar de forma majoritária na sinalização de AhR em relação a SOCS2 nos animais WT após a fase de pico da doença, resultando em resolução do processo inflamatório. Além do mais, como já mencionado acima, AhR tem efeitos dualísticos sobre a modulação da atividade de linfócitos. Dependendo do ambiente de estímulo para o receptor, pode ser induzida a diferenciação de células Th17 ou Treg, o que implicaria de forma direta no desenvolvimento da EAE. Diante disso, após alcançado o pico inflamatório, estímulos, os quais ainda não podemos detalhar, podem atuar de forma semelhante ao agonista TCDD, induzindo uma atividade anti-inflamatória na cascata de sinalização de AhR. E nesse sentido, SOCS2 pode vir a ser um fator importante nessa cascata de sinalização. Pode ser que, em camundongos SOCS2<sup>-/-</sup>, essa via resolutive de AhR possa ser ativada após o pico de EAE, mas a ausência da proteína bloquearia o mecanismo resolutive subsequente, resultando na

perpetuação do perfil inflamatório observado. Vale ressaltar que não foi possível adicionar o estudo com animais nocautes para 5-LO devido ao *background* genético destes ser diferente, o que não possibilita uma comparação ideal no estudo. De qualquer forma, é possível que a enzima tenha participação no início da mencionada via de sinalização. Estudos posteriores e mais detalhados visando a associação de 5-LO no mecanismo deverão ser realizados pelo grupo.

Em nosso modelo é possível que, após a imunização, a enzima 5-LO em células no SNC pode ser ativada por um dado estímulo após a chegada de células efectoras, estímulos estes que podem ser produtos inflamatórios liberados por estas mesmas células ou pelas células residentes ativadas, como micróglia ou astrócitos, por exemplo. Uma vez ativada, a enzima poderia produzir mediadores que se ligariam e ativariam o receptor AhR, levando então a sua translocação para o núcleo e iniciando assim a transcrição do gene *socs2*. Uma vez expressa, a proteína SOCS2 pode então atuar na modulação do desenvolvimento da EAE através da regulação da geração/expansão de células imunes, produção de importantes citocinas e também a produção de quimiocinas que recrutam mais células para o SNC.

Como discutido anteriormente, após a primeira fase da doença, a fase de remissão é caracterizada pela redução na população de células efectoras no SNC e consequente diminuição da inflamação em animais do tipo selvagem. De fato, isso foi observado em todos nossos experimentos. Porém, os animais deficientes não apresentam esse perfil. Pelo contrário, a doença se mostra severa nos mesmos em sua fase tardia. É bem descrito que células T reguladoras possuem papel importante no controle dos linfócitos efetores nessa fase da EAE, controlando assim a resposta pró-inflamatória dos mesmos.

Estudos iniciais de genômica revelaram que a molécula de SOCS2 é preferencialmente expressa tanto em células Treg naturais (nTregs) quanto aquelas induzidas (iTregs) após estímulo (Sugimoto, Oida *et al.* 2006; Hill, Feuerer *et al.* 2007). Em um estudo mais recente, foi demonstrado que SOCS2 é uma molécula-chave na estabilidade de células Treg induzidas (Knosp, Schiering *et al.* 2013). Apesar de não ter qualquer influência sobre células nTreg, SOCS2 é necessário para a estabilidade da expressão do seu fator de transcrição, FoxP3, tanto *in vitro* quanto *in vivo* em células iTregs, o que o torna crucial na manutenção da função anti-inflamatória de células Treg, controlando assim respostas pró-inflamatórias. Nas células iTreg SOCS2<sup>-/-</sup>, há aumento da expressão de IFN- $\gamma$  e IL-13, bem como nos níveis de fosforilação de STAT6 (Knosp, Schiering *et al.* 2013).

Não se sabe ainda se SOCS2 possui papel direto na diferenciação ou função de outros subtipos de células T, tais como Th1 e Th17, mas o comprometimento para um fenótipo está relacionado com a inibição de outros e isso é muito importante no modelo de EAE. Entretanto, assim como no modelo *in vivo* de administração por ovoalbumina de Knosp, nosso modelo possui parâmetros autoimunes que necessitam de atividade eficiente e por período relativamente longo das células Tregs. Consistente com isso, camundongos SOCS2<sup>-/-</sup> apresentam reduzido infiltrado destas células no SNC em todos os estágios analisados da EAE. Diante disso, esses eventos provavelmente resultam em, uma vez iniciada sua ativação e expansão, na atividade descontrolada e permanente de células efetoras nesses animais, resultando em inflamação severa na fase tardia. Isso é corroborado pelas análises de histologia assim como nos níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias observados nos animais nocautes nessa fase da doença. Além do mais,

os níveis de quimiocinas aumentados no cérebro desses animais também podem auxiliar a permanência de infiltrado celular.

Outro fato que merece pontuar, SOCS2 modula o desenvolvimento neuronal induzindo a diferenciação de células progenitoras neuronais para neurônios ou astrócitos através da sinalização de GH (Turnley, Faux *et al.* 2002). A proteína é altamente expressa em fases pré e pós-natal. Durante a fase de pico do desenvolvimento neuronal, ainda no período embrionário, SOCS2 tem sua expressão significativamente aumentada, o que sugere seu envolvimento nesse processo (Polizzotto, Bartlett *et al.* 2000). Camundongos SOCS2<sup>-/-</sup> possuem reduzido número de células neuronais no córtex cerebral e também apresentam redução na população de células progenitoras neuronais as quais se diferenciam posteriormente em neurônios (Ransome, Goldshmit *et al.* 2004). Scott *et al* relataram que a alta expressão de SOCS2 resultou em alteração da morfologia dos neurônios, tendo estes seus tamanhos aumentados. Entretanto, não houve mudanças no perfil das suas propriedades eletrofisiológicas quando comparado com as células do tipo selvagem (Scott, Stebbing *et al.* 2006). Devido ao fato de GH estar associado com o desenvolvimento do SNC e SOCS2 ser um regulador negativo desse hormônio, ao que tudo indica ambas moléculas são muito importantes em relação ao estabelecimento da população neuronal. A deficiência neuronal nos animais SOCS2<sup>-/-</sup> na EAE poderia também ser um evento importante pois, após serem danificadas pelo processo inflamatório, células neuronais poderiam encontrar de alguma forma maior dificuldade para reestabelecer sua funcionalidade. Além do mais, o menor número desse tipo celular também poderia ser outro fator limitante para a recuperação de função da rede neuronal na fase tardia da doença.

Resultados preliminares do grupo sugerem que SOCS2 pode regular a atividade de NLRP3 durante EAE. Nesses experimentos iniciais, a expressão de *nlrp3*, *IL-1 $\beta$*  e *IL-18* no cérebro de animais SOCS2<sup>-/-</sup> é aumentada em relação aos animais WT, principalmente em 14 dpi. Isso poderia ser um indicativo de que SOCS2 pode ser um regulador para esse inflamassoma durante a EAE. Nenhum estudo foi descrito até o momento sobre a associação entre SOCS2 e NLRP3. Entretanto, Inoue *et al* descreveram que SOCS1, um outro componente da família SOCS, está envolvido na inibição de NLRP3 em macrófagos após estímulo com IFN- $\beta$  (Inoue, Williams *et al.* 2012). A ubiquitinação e posterior degradação de Rac1 reduz a produção de ROS e consequentemente inibição da atividade de NLRP3 (Inoue, Williams *et al.* 2012). Uma vez que SOCS2 também pode atuar como uma ubiquitina-ligase de moléculas possivelmente envolvidas na ativação do inflamassoma e também pode regular a atividade de outros componentes da própria família, incluindo SOCS1, podemos hipotetizar que a proteína desempenha algum papel na modulação da atividade do complexo NLRP3 durante EAE.

Diversos trabalhos relatam o envolvimento de NLRP3 tanto na esclerose múltipla quanto na EAE. Tanto as proteínas que compõem o complexo quanto diversos agonistas, como ATP, ácido úrico, por exemplo, têm sido encontrados em amostras de pacientes com EM e camundongos com EAE (Furlan, Martino *et al.* 1999; Ming, Li *et al.* 2002; Gris, Ye *et al.* 2010; Jha, Srivastava *et al.* 2010; Inoue, Williams *et al.* 2012). A atividade de NLRP3 induz a migração de células T para o SNC assim como APCs e isso é um importante fator para a resistência de animais ASC<sup>-/-</sup> e NLRP3<sup>-/-</sup> após indução (Inoue, Williams *et al.* 2012). Além do mais, a deficiência de NLRP3 também resulta em redução na expressão de quimiocinas e seus receptores em APCs (Inoue, Williams *et al.* 2012).

Também, IL-1 $\beta$  ativada, produto final da atividade de NLRP3, aumenta significativamente a permeabilidade da BHE, aumentando assim o infiltrado de linfócitos para o SNC. Esses mecanismos resultam em impacto direto na severidade da doença.

Outro fato importante é que o tratamento com IFN- $\beta$  em camundongos se mostrou eficiente apenas quando a doença foi induzida de uma forma dependente do inflamassoma. Nesse estudo, a indução típica de EAE foi dependente de NLRP3 e o tratamento foi eficiente, bloqueando o inflamassoma. Entretanto, quando a indução foi realizada com maior carga de adjuvante, animais com EAE atípica, a qual é independente da atividade de NLRP3, não responderam ao tratamento com IFN- $\beta$  (Inoue, Williams *et al.* 2012). Isso pode sugerir que mecanismos envolvendo NLRP3 possivelmente estão relacionados com a presença ou não da responsividade ao tratamento observada nos pacientes com EM. Como uma das principais funções do NLRP3 é a maturação de IL- $\beta$  e sendo que esta citocina desempenha importante papel em processos como a desmielinização, quebra da BHE e ativação de micróglia, isto pode ser um indicador da complexidade do tratamento na esclerose múltipla em humanos, uma vez que um terço dos pacientes não apresenta qualquer tipo de resposta ao tratamento com IFN- $\beta$  (Inoue e Shinohara 2013). Um estudo demonstrou que EAE passiva induzida em camundongos pela transferência de linfócitos Th1 foi suscetível ao tratamento com IFN- $\beta$ , sendo que este resultado não foi possível naqueles animais que receberam células Th17 polarizadas. Uma vez que a doença resultante desse tipo de indução é dependente de mecanismos regulados por NLRP3, é possível que a ativação do inflamassoma seja mais eficaz por EAE passiva mediada por Th1, porém isso ainda não está esclarecido. (Axtell, de Jong *et al.* 2010; Takeuchi e Akira 2010; Doria, Zen *et al.* 2012).

Estudos sobre a atividade de NLRP3 no SNC, que é o sítio de foco principal no estudo da EM, são ainda escassos e necessários. Não está claro ainda se o inflamassoma NLRP3 é operativo em células do SNC, assim como o faz em outros tipos celulares, como macrófagos e células dendríticas, por exemplo. Até o momento, existem poucos estudos sugerindo um papel para NLRP3 no SNC. O desenvolvimento de camundongos NLRP3<sup>-/-</sup> tem trazido grandes vantagens e muitos estudos estão sendo feitos nesse sentido. Um estudo relata a atividade de NLRP3 no cérebro de camundongos em modelo experimental de depressão (Zhang, Liu *et al.* 2014). Em outro estudo, Tan e colaboradores sugerem que o inflamassoma pode ser ativado em micróglia após estímulo com  $\beta$ -amilóide, o que remete sua importância na doença de Alzheimer (Tan, Yu *et al.* 2013). Mogi e colaboradores demonstraram que, entre outros fatores inflamatórios, IL-1 $\beta$  tem sua expressão elevada em amostras de pacientes com doença de Parkinson (Mogi, Harada *et al.* 1994).

Os resultados aqui apresentados sugerem que há atividade de NLRP3 no pico da EAE, uma vez que caspase-1 ativada é presente em células isoladas do cérebro dos animais e que a presença do inflamassoma no SNC atua como um amplificador da severidade da doença. Possivelmente, NLRP3 atua tanto no sistema periférico quanto no SNC. Em um primeiro momento induzindo a migração e atividade de células inflamatórias em direção ao sítio nervoso. Em um segundo momento, no SNC sua atividade em células residentes se torna importante para amplificar o processo inflamatório local.

Nossos achados indicam que micróglia são as células residentes responsáveis por essa amplificação da resposta inflamatória no SNC via atividade de NLRP3. A capacidade de astrócitos produzirem a maquinaria do inflamassoma NLRP3 parece ser

ausente. Uma vez que esta é a maior população de célula no SNC, talvez de fato isso seja biologicamente adequado. Vale ressaltar que não sabemos ainda se a resposta de astrócitos seja similar *in vivo*, na presença de outras células e fatores secretados.

De acordo com nossos achados, linfócitos Th17 são mais eficazes em induzir a produção de IL-1 $\beta$  pelas micróglia. Isso pode ser uma consequência da forte patogenicidade que este fenótipo celular possui no modelo de EAE. Uma vez que células Th1 são cruciais no estabelecimento da doença, porém linfócitos Th17 também são importantes na amplificação dos eventos inflamatórios, a atuação dessas células sobre a atividade de NLRP3 em células residentes do SNC pode resultar na amplificação da resposta inflamatória.

Nossos resultados indicam que a atividade de NLRP3 especificamente no SNC é um mecanismo importante de amplificação da resposta. Uma vez que SOCS2 possivelmente atua na regulação deste inflamassoma e que o mesmo está relacionado a responsividade ou não do tratamento com IFN- $\beta$ , abre-se novas janelas de estudo para tratamento da esclerose múltipla.



## **6. Conclusões**

Os resultados obtidos apontam SOCS2 como uma molécula muito importante na EAE, onde atua de forma dualística nas diferentes fases do desenvolvimento da doença. Na primeira fase, a ausência da proteína está envolvida com diminuição dos parâmetros inflamatórios, regulando a chegada de linfócitos e liberação de citocinas. A expressão de SOCS2 também é associada com a expressão de 5-LO/AhR durante a EAE. Por outro lado, na fase de resolução da doença, a ausência de SOCS2 é prejudicial, sendo que os animais não conseguem recuperar-se dos danos provocados pelo processo inflamatório.

Além do mais, a atividade do inflamassoma NLRP3 especificamente no SNC é um mecanismo amplificador da severidade de EAE. Nesse sentido, os resultados sugerem que micróglia são as células que desenvolvem eficientemente a atividade de NLRP3 após estímulos e as células que infiltram o SNC após indução de EAE possivelmente são capazes de induzir a ativação do inflamassoma nessas células.

## 7. Referências Bibliográficas

1. Almeida, A. R., B. Zaragoza and A. A. Freitas (2006). "Indexation as a novel mechanism of lymphocyte homeostasis: the number of CD4+CD25+ regulatory T cells is indexed to the number of IL-2-producing cells." J Immunol **177**(1): 192-200.
2. Aloisi, F. (2001). "Immune function of microglia." Glia **36**(2): 165-179.
3. Aloisi, F., F. Ria, G. Penna and L. Adorini (1998). "Microglia are more efficient than astrocytes in antigen processing and in Th1 but not Th2 cell activation." J Immunol **160**(10): 4671-4680.
4. Amor, S., N. Groome, C. Linington, M. M. Morris, K. Dornmair, M. V. Gardinier, J. M. Matthieu and D. Baker (1994). "Identification of epitopes of myelin oligodendrocyte glycoprotein for the induction of experimental allergic encephalomyelitis in SJL and Biozzi AB/H mice." J Immunol **153**(10): 4349-4356.
5. Amorini, A. M., A. Petzold, B. Tavazzi, J. Eikelenboom, G. Keir, A. Belli, G. Giovannoni, V. Di Pietro, C. Polman, S. D'Urso, R. Vagnozzi, B. Uitdehaag and G. Lazzarino (2009). "Increase of uric acid and purine compounds in biological fluids of multiple sclerosis patients." Clin Biochem **42**(10-11): 1001-1006.
6. Axtell, R. C., B. A. de Jong, K. Boniface, L. F. van der Voort, R. Bhat, P. De Sarno, R. Naves, M. Han, F. Zhong, J. G. Castellanos, R. Mair, A. Christakos, I. Kolkowitz, L. Katz, J. Killestein, C. H. Polman, R. de Waal Malefyt, L. Steinman and C. Raman (2010). "T helper type 1 and 17 cells determine efficacy of interferon-beta in multiple sclerosis and experimental encephalomyelitis." Nat Med **16**(4): 406-412.
7. Barnett, M. H. and J. W. Prineas (2004). "Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion." Ann Neurol **55**(4): 458-468.
8. Bettelli, E., M. Pagany, H. L. Weiner, C. Linington, R. A. Sobel and V. K. Kuchroo (2003). "Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis." J Exp Med **197**(9): 1073-1081.
9. Bever, C. T., Jr., H. S. Panitch and K. P. Johnson (1994). "Increased cathepsin B activity in peripheral blood mononuclear cells of multiple sclerosis patients." Neurology **44**(4): 745-748.

10. Brunner, C., H. Lassmann, T. V. Waehnel, J. M. Matthieu and C. Linington (1989). "Differential ultrastructural localization of myelin basic protein, myelin/oligodendroglial glycoprotein, and 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in the CNS of adult rats." J Neurochem **52**(1): 296-304.
11. Cahoy, J. D., B. Emery, A. Kaushal, L. C. Foo, J. L. Zamanian, K. S. Christopherson, Y. Xing, J. L. Lubischer, P. A. Krieg, S. A. Krupenko, W. J. Thompson and B. A. Barres (2008). "A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function." J Neurosci **28**(1): 264-278.
12. Chastain, E. M., D. S. Duncan, J. M. Rodgers and S. D. Miller (2011). "The role of antigen presenting cells in multiple sclerosis." Biochim Biophys Acta **1812**(2): 265-274.
13. Chen, G. Y. and G. Nunez (2010). "Sterile inflammation: sensing and reacting to damage." Nat Rev Immunol **10**(12): 826-837.
14. Chiaro, C. R., J. L. Morales, K. S. Prabhu and G. H. Perdew (2008). "Leukotriene A4 metabolites are endogenous ligands for the Ah receptor." Biochemistry **47**(32): 8445-8455.
15. Comi, G., V. Martinelli, M. Rodegher, L. Moiola, O. Bajenaru, A. Carra, I. Elovaara, F. Fazekas, H. P. Hartung, J. Hillert, J. King, S. Komoly, C. Lubetzki, X. Montalban, K. M. Myhr, M. Ravnborg, P. Rieckmann, D. Wynn, C. Young, M. Filippi and C. s. g. Pre (2009). "Effect of glatiramer acetate on conversion to clinically definite multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndrome (PreCISe study): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial." Lancet **374**(9700): 1503-1511.
16. Compston, A. and A. Coles (2008). "Multiple sclerosis." Lancet **372**(9648): 1502-1517.
17. Confavreux, C. and S. Vukusic (2006). "Natural history of multiple sclerosis: a unifying concept." Brain **129**(Pt 3): 606-616.
18. Constantinescu, C. S., N. Farooqi, K. O'Brien and B. Gran (2011). "Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS)." Br J Pharmacol **164**(4): 1079-1106.

19. Cross, A. H. and R. T. Naismith (2014). "Established and novel disease-modifying treatments in multiple sclerosis." J Intern Med **275**(4): 350-363.
20. Cross, A. H. and E. Waubant (2011). "MS and the B cell controversy." Biochim Biophys Acta **1812**(2): 231-238.
21. Cruz, C. M., A. Rinna, H. J. Forman, A. L. Ventura, P. M. Persechini and D. M. Ojcius (2007). "ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages." J Biol Chem **282**(5): 2871-2879.
22. Davey, H. W., M. J. McLachlan, R. J. Wilkins, D. J. Hilton and T. E. Adams (1999). "STAT5b mediates the GH-induced expression of SOCS-2 and SOCS-3 mRNA in the liver." Mol Cell Endocrinol **158**(1-2): 111-116.
23. de Alba, E. (2009). "Structure and interdomain dynamics of apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC)." J Biol Chem **284**(47): 32932-32941.
24. De Stefano, N., G. Comi, L. Kappos, M. S. Freedman, C. H. Polman, B. M. Uitdehaag, B. Hennessy, F. Casset-Semanaz, L. Lehr, B. Stubinski, D. L. Jack and F. Barkhof (2014). "Efficacy of subcutaneous interferon beta-1a on MRI outcomes in a randomised controlled trial of patients with clinically isolated syndromes." J Neurol Neurosurg Psychiatry **85**(6): 647-653.
25. Doria, A., M. Zen, S. Bettio, M. Gatto, N. Bassi, L. Nalotto, A. Ghirardello, L. Iaccarino and L. Punzi (2012). "Autoinflammation and autoimmunity: bridging the divide." Autoimmun Rev **12**(1): 22-30.
26. dos Santos, A. C., M. M. Barsante, R. M. Arantes, C. C. Bernard, M. M. Teixeira and J. Carvalho-Tavares (2005). "CCL2 and CCL5 mediate leukocyte adhesion in experimental autoimmune encephalomyelitis--an intravital microscopy study." J Neuroimmunol **162**(1-2): 122-129.
27. Emerson, M. R. and S. M. LeVine (2004). "Experimental allergic encephalomyelitis is exacerbated in mice deficient for 12/15-lipoxygenase or 5-lipoxygenase." Brain Res **1021**(1): 140-145.
28. Eng, L. F., R. S. Ghirnikar and Y. L. Lee (2000). "Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000)." Neurochem Res **25**(9-10): 1439-1451.

29. Esper, L., D. Roman-Campos, A. Lara, F. Brant, L. L. Castro, A. Barroso, R. R. S. Araujo, L. Q. Vieira, S. Mukherjee, E. R. M. Gomes, N. N. Rocha, I. P. R. Ramos, M. P. Lisanti, C. F. Campos, R. M. E. Arantes, S. Guatimosim, L. M. Weiss, J. S. Cruz, H. B. Tanowitz, M. M. Teixeira and F. S. Machado (2012). "Role of SOCS2 in Modulating Heart Damage and Function in a Murine Model of Acute Chagas Disease." American Journal of Pathology **181**(1): 130-140.
30. Esser, C., A. Rannug and B. Stockinger (2009). "The aryl hydrocarbon receptor in immunity." Trends Immunol **30**(9): 447-454.
31. Favre, H., A. Benhamou, J. Finidori, P. A. Kelly and M. Edery (1999). "Dual effects of suppressor of cytokine signaling (SOCS-2) on growth hormone signal transduction." FEBS Lett **453**(1-2): 63-66.
32. Ferber, I. A., S. Brocke, C. Taylor-Edwards, W. Ridgway, C. Dinisco, L. Steinman, D. Dalton and C. G. Fathman (1996). "Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)." J Immunol **156**(1): 5-7.
33. Ferreira, M. L., M. I. Machado, M. L. Vilela, M. J. Guedes, L. Ataide, Jr., S. Santos and S. G. Laurentino (2004). "[Epidemiology of 118 cases of multiple sclerosis after 15 years of follow-up on the reference center of Hospital da Restauracao, Recife, Pernambuco, Brazil]." Arq Neuropsiquiatr **62**(4): 1027-1032.
34. Fife, B. T., G. B. Huffnagle, W. A. Kuziel and W. J. Karpus (2000). "CC chemokine receptor 2 is critical for induction of experimental autoimmune encephalomyelitis." J Exp Med **192**(6): 899-905.
35. Fitzgerald, K. A. (2010). "NLR-containing inflammasomes: central mediators of host defense and inflammation." Eur J Immunol **40**(3): 595-598.
36. Fragoso, Y. D. and A. P. Fiore (2005). "Description and characteristics of 81 patients attending the Reference Center for Multiple Sclerosis of the coastal region of the state of Sao Paulo-Brazil." Arq Neuropsiquiatr **63**(3B): 741-744.
37. Frohman, E. M., M. K. Racke and C. S. Raine (2006). "Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis." N Engl J Med **354**(9): 942-955.
38. Furlan, R., G. Martino, F. Galbiati, P. L. Poliani, S. Smiroldo, A. Bergami, G. Desina, G. Comi, R. Flavell, M. S. Su and L. Adorini (1999). "Caspase-1 regulates the

- inflammatory process leading to autoimmune demyelination." J Immunol **163**(5): 2403-2409.
39. Gasiewicz, T. A., E. C. Henry and L. L. Collins (2008). "Expression and activity of aryl hydrocarbon receptors in development and cancer." Crit Rev Eukaryot Gene Expr **18**(4): 279-321.
40. Glabinski, A. R., M. Tani, V. K. Tuohy and R. M. Ransohoff (1997). "Murine experimental autoimmune encephalomyelitis: a model of immune-mediated inflammation and multiple sclerosis." Methods Enzymol **288**: 182-190.
41. Gris, D., Z. Ye, H. A. Iocca, H. Wen, R. R. Craven, P. Gris, M. Huang, M. Schneider, S. D. Miller and J. P. Ting (2010). "NLRP3 plays a critical role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis by mediating Th1 and Th17 responses." J Immunol **185**(2): 974-981.
42. Halle, A., V. Hornung, G. C. Petzold, C. R. Stewart, B. G. Monks, T. Reinheckel, K. A. Fitzgerald, E. Latz, K. J. Moore and D. T. Golenbock (2008). "The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta." Nat Immunol **9**(8): 857-865.
43. Hamby, M. E., G. Coppola, Y. Ao, D. H. Geschwind, B. S. Khakh and M. V. Sofroniew (2012). "Inflammatory mediators alter the astrocyte transcriptome and calcium signaling elicited by multiple G-protein-coupled receptors." J Neurosci **32**(42): 14489-14510.
44. Hao, N. and M. L. Whitelaw (2013). "The emerging roles of AhR in physiology and immunity." Biochem Pharmacol **86**(5): 561-570.
45. Heneka, M. T. (2014). "Macrophages derived from infiltrating monocytes mediate autoimmune myelin destruction." J Exp Med **211**(8): 1500.
46. Hill, J. A., M. Feuerer, K. Tash, S. Haxhinasto, J. Perez, R. Melamed, D. Mathis and C. Benoist (2007). "Foxp3 transcription-factor-dependent and -independent regulation of the regulatory T cell transcriptional signature." Immunity **27**(5): 786-800.
47. Holm, T. H., D. Draeby and T. Owens (2012). "Microglia are required for astroglial Toll-like receptor 4 response and for optimal TLR2 and TLR3 response." Glia **60**(4): 630-638.

48. Hornung, V., F. Bauernfeind, A. Halle, E. O. Samstad, H. Kono, K. L. Rock, K. A. Fitzgerald and E. Latz (2008). "Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization." Nat Immunol **9**(8): 847-856.
49. Huang, W. X., P. Huang and J. Hillert (2004). "Increased expression of caspase-1 and interleukin-18 in peripheral blood mononuclear cells in patients with multiple sclerosis." Mult Scler **10**(5): 482-487.
50. Inagaki-Ohara, K., T. Kondo, M. Ito and A. Yoshimura (2013). "SOCS, inflammation, and cancer." JAKSTAT **2**(3): e24053.
51. Inohara, Chamaillard, C. McDonald and G. Nunez (2005). "NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease." Annu Rev Biochem **74**: 355-383.
52. Inoue, M. and M. L. Shinohara (2013). "The role of interferon-beta in the treatment of multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis - in the perspective of inflammasomes." Immunology **139**(1): 11-18.
53. Inoue, M., K. L. Williams, T. Oliver, P. Vandenabeele, J. V. Rajan, E. A. Miao and M. L. Shinohara (2012). "Interferon-beta therapy against EAE is effective only when development of the disease depends on the NLRP3 inflammasome." Sci Signal **5**(225): ra38.
54. Ivanov, Ii, B. S. McKenzie, L. Zhou, C. E. Tadokoro, A. Lepelley, J. J. Lafaille, D. J. Cua and D. R. Littman (2006). "The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells." Cell **126**(6): 1121-1133.
55. Jha, S., S. Y. Srivastava, W. J. Brickey, H. Iocca, A. Toews, J. P. Morrison, V. S. Chen, D. Gris, G. K. Matsushima and J. P. Ting (2010). "The inflammasome sensor, NLRP3, regulates CNS inflammation and demyelination via caspase-1 and interleukin-18." J Neurosci **30**(47): 15811-15820.
56. Jin, C. and R. A. Flavell (2010). "Molecular mechanism of NLRP3 inflammasome activation." J Clin Immunol **30**(5): 628-631.
57. John, G. R., S. C. Lee and C. F. Brosnan (2003). "Cytokines: powerful regulators of glial cell activation." Neuroscientist **9**(1): 10-22.

58. Kamm, C. P., B. M. Uitdehaag and C. H. Polman (2014). "Multiple sclerosis: current knowledge and future outlook." Eur Neurol **72**(3-4): 132-141.
59. Kanneganti, T. D., M. Lamkanfi and G. Nunez (2007). "Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease." Immunity **27**(4): 549-559.
60. Kappos, L., M. S. Freedman, C. H. Polman, G. Edan, H. P. Hartung, D. H. Miller, X. Montalban, F. Barkhof, E. W. Radu, L. Bauer, S. Dahms, V. Lanius, C. Pohl, R. Sandbrink and B. S. Group (2007). "Effect of early versus delayed interferon beta-1b treatment on disability after a first clinical event suggestive of multiple sclerosis: a 3-year follow-up analysis of the BENEFIT study." Lancet **370**(9585): 389-397.
61. Khakh, B. S. and M. V. Sofroniew (2015). "Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits." Nat Neurosci **18**(7): 942-952.
62. Khalil, M., M. Reindl, A. Lutterotti, B. Kuenz, R. Ehling, C. Gneiss, P. Lackner, F. Deisenhammer and T. Berger (2006). "Epitope specificity of serum antibodies directed against the extracellular domain of myelin oligodendrocyte glycoprotein: Influence of relapses and immunomodulatory treatments." J Neuroimmunol **174**(1-2): 147-156.
63. Kim, J. J. and E. K. Jo (2013). "NLRP3 inflammasome and host protection against bacterial infection." J Korean Med Sci **28**(10): 1415-1423.
64. Kimelberg, H. K. (2010). "Functions of mature mammalian astrocytes: a current view." Neuroscientist **16**(1): 79-106.
65. Knosp, C. A., H. P. Carroll, J. Elliott, S. P. Saunders, H. J. Nel, S. Amu, J. C. Pratt, S. Spence, E. Doran, N. Cooke, R. Jackson, J. Swift, D. C. Fitzgerald, L. G. Heaney, P. G. Fallon, A. Kissenpfennig and J. A. Johnston (2011). "SOCS2 regulates T helper type 2 differentiation and the generation of type 2 allergic responses." J Exp Med **208**(7): 1523-1531.
66. Knosp, C. A., C. Schiering, S. Spence, H. P. Carroll, H. J. Nel, M. Osbourn, R. Jackson, O. Lyubomska, B. Malissen, R. Ingram, D. C. Fitzgerald, F. Powrie, P. G. Fallon, J. A. Johnston and A. Kissenpfennig (2013). "Regulation of Foxp3+ inducible regulatory T cell stability by SOCS2." J Immunol **190**(7): 3235-3245.



67. Koenigsknecht-Talboo, J. and G. E. Landreth (2005). "Microglial phagocytosis induced by fibrillar beta-amyloid and IgGs are differentially regulated by proinflammatory cytokines." J Neurosci **25**(36): 8240-8249.
68. Korn, T., J. Reddy, W. Gao, E. Bettelli, A. Awasthi, T. R. Petersen, B. T. Backstrom, R. A. Sobel, K. W. Wucherpfennig, T. B. Strom, M. Oukka and V. K. Kuchroo (2007). "Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation." Nat Med **13**(4): 423-431.
69. Kroenke, M. A., T. J. Carlson, A. V. Andjelkovic and B. M. Segal (2008). "IL-12- and IL-23-modulated T cells induce distinct types of EAE based on histology, CNS chemokine profile, and response to cytokine inhibition." J Exp Med **205**(7): 1535-1541.
70. Lafaille, J. J., K. Nagashima, M. Katsuki and S. Tonegawa (1994). "High incidence of spontaneous autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice." Cell **78**(3): 399-408.
71. Langrish, C. L., Y. Chen, W. M. Blumenschein, J. Mattson, B. Basham, J. D. Sedgwick, T. McClanahan, R. A. Kastelein and D. J. Cua (2005). "IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation." J Exp Med **201**(2): 233-240.
72. Lawson, L. J., V. H. Perry, P. Dri and S. Gordon (1990). "Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain." Neuroscience **39**(1): 151-170.
73. Lee, Y., A. Awasthi, N. Yosef, F. J. Quintana, S. Xiao, A. Peters, C. Wu, M. Kleinewietfeld, S. Kunder, D. A. Hafler, R. A. Sobel, A. Regev and V. K. Kuchroo (2012). "Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells." Nat Immunol **13**(10): 991-999.
74. Lim, S. Y. and C. S. Constantinescu (2010). "Current and future disease-modifying therapies in multiple sclerosis." Int J Clin Pract **64**(5): 637-650.
75. Loda, E. and R. Balabanov (2012). "Interferon regulatory factor 1 regulation of oligodendrocyte injury and inflammatory demyelination." Rev Neurosci **23**(2): 145-152.

76. Lohoff, M. and T. W. Mak (2005). "Roles of interferon-regulatory factors in T-helper-cell differentiation." Nat Rev Immunol **5**(2): 125-135.
77. Lu, A., V. G. Magupalli, J. Ruan, Q. Yin, M. K. Atianand, M. R. Vos, G. F. Schroder, K. A. Fitzgerald, H. Wu and E. H. Egelman (2014). "Unified polymerization mechanism for the assembly of ASC-dependent inflammasomes." Cell **156**(6): 1193-1206.
78. Lublin, F. D. and S. C. Reingold (1996). "Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis." Neurology **46**(4): 907-911.
79. Lucchinetti, C., W. Bruck, J. Parisi, B. Scheithauer, M. Rodriguez and H. Lassmann (2000). "Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination." Ann Neurol **47**(6): 707-717.
80. Machado, F. S., L. Esper, A. Dias, R. Madan, Y. Gu, D. Hildeman, C. N. Serhan, C. L. Karp and J. Aliberti (2008). "Native and aspirin-triggered lipoxins control innate immunity by inducing proteasomal degradation of TRAF6." J Exp Med **205**(5): 1077-1086.
81. Machado, F. S., J. Johndrow, A. Bafica, A. Dias and J. Aliberti (2005). "SOCS-2 mediates LXA4 dependent inhibition of IL-12 production by dendritic cells." Faseb Journal **19**(4): A372-A372.
82. Machado, F. S., J. E. Johndrow, L. Esper, A. Dias, A. Bafica, C. N. Serhan and J. Aliberti (2006). "Anti-inflammatory actions of lipoxin A4 and aspirin-triggered lipoxin are SOCS-2 dependent." Nat Med **12**(3): 330-334.
83. Mayer, M. C. and E. Meinel (2012). "Glycoproteins as targets of autoantibodies in CNS inflammation: MOG and more." Ther Adv Neurol Disord **5**(3): 147-159.
84. McBerry, C., R. M. Gonzalez, N. Shryock, A. Dias and J. Aliberti (2012). "SOCS2-induced proteasome-dependent TRAF6 degradation: a common anti-inflammatory pathway for control of innate immune responses." PLoS One **7**(6): e38384.
85. Metcalf, D., C. J. Greenhalgh, E. Viney, T. A. Willson, R. Starr, N. A. Nicola, D. J. Hilton and W. S. Alexander (2000). "Gigantism in mice lacking suppressor of cytokine signalling-2." Nature **405**(6790): 1069-1073.

86. Ming, X., W. Li, Y. Maeda, B. Blumberg, S. Raval, S. D. Cook and P. C. Dowling (2002). "Caspase-1 expression in multiple sclerosis plaques and cultured glial cells." J Neurol Sci **197**(1-2): 9-18.
87. Mogi, M., M. Harada, T. Kondo, P. Riederer, H. Inagaki, M. Minami and T. Nagatsu (1994). "Interleukin-1 beta, interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha are elevated in the brain from parkinsonian patients." Neurosci Lett **180**(2): 147-150.
88. Moreira, M. A., C. P. Tilbery, M. A. Lana-Peixoto, M. F. Mendes, D. R. Kaimen-Macieli and D. Callegaro (2002). "[Historical aspects of multiple sclerosis]." Rev Neurol **34**(4): 379-383.
89. Nimmerjahn, A., F. Kirchhoff and F. Helmchen (2005). "Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo." Science **308**(5726): 1314-1318.
90. Olivares-Villagomez, D., Y. Wang and J. J. Lafaille (1998). "Regulatory CD4(+) T cells expressing endogenous T cell receptor chains protect myelin basic protein-specific transgenic mice from spontaneous autoimmune encephalomyelitis." J Exp Med **188**(10): 1883-1894.
91. Parkhurst, C. N., G. Yang, I. Ninan, J. N. Savas, J. R. Yates, 3rd, J. J. Lafaille, B. L. Hempstead, D. R. Littman and W. B. Gan (2013). "Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor." Cell **155**(7): 1596-1609.
92. Pender, M. P., P. A. Csurhes, C. Smith, L. Beagley, K. D. Hooper, M. Raj, A. Coulthard, S. R. Burrows and R. Khanna (2014). "Epstein-Barr virus-specific adoptive immunotherapy for progressive multiple sclerosis." Mult Scler **20**(11): 1541-1544.
93. Petrilli, V., S. Papin, C. Dostert, A. Mayor, F. Martinon and J. Tschopp (2007). "Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration." Cell Death Differ **14**(9): 1583-1589.
94. Pham-Dinh, D., M. G. Mattei, J. L. Nussbaum, G. Roussel, P. Pontarotti, N. Roeckel, I. H. Mather, K. Artzt, K. F. Lindahl and A. Dautigny (1993). "Myelin/oligodendrocyte glycoprotein is a member of a subset of the

- immunoglobulin superfamily encoded within the major histocompatibility complex." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(17): 7990-7994.
95. Polizzotto, M. N., P. F. Bartlett and A. M. Turnley (2000). "Expression of "suppressor of cytokine signalling" (SOCS) genes in the developing and adult mouse nervous system." J Comp Neurol **423**(2): 348-358.
96. Quintana, F. J., A. S. Basso, A. H. Iglesias, T. Korn, M. F. Farez, E. Bettelli, M. Caccamo, M. Oukka and H. L. Weiner (2008). "Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor." Nature **453**(7191): 65-71.
97. Radmark, O., O. Werz, D. Steinhilber and B. Samuelsson (2007). "5-Lipoxygenase: regulation of expression and enzyme activity." Trends Biochem Sci **32**(7): 332-341.
98. Ramagopalan, S. V., R. Dobson, U. C. Meier and G. Giovannoni (2010). "Multiple sclerosis: risk factors, prodromes, and potential causal pathways." Lancet Neurol **9**(7): 727-739.
99. Ransohoff, R. M., D. A. Hafler and C. F. Lucchinetti (2015). "Multiple sclerosis-a quiet revolution." Nat Rev Neurol **11**(3): 134-142.
100. Ransome, M. I., Y. Goldshmit, P. F. Bartlett, M. J. Waters and A. M. Turnley (2004). "Comparative analysis of CNS populations in knockout mice with altered growth hormone responsiveness." Eur J Neurosci **19**(8): 2069-2079.
101. Rathinam, V. A., S. K. Vanaja and K. A. Fitzgerald (2012). "Regulation of inflammasome signaling." Nat Immunol **13**(4): 333-342.
102. Ren, Z., Y. Wang, D. Liebson, T. Liggett, R. Goswami, D. Stefoski and R. Balabanov (2011). "IRF-1 signaling in central nervous system glial cells regulates inflammatory demyelination." J Neuroimmunol **233**(1-2): 147-159.
103. Ren, Z., Y. Wang, D. Tao, D. Liebson, T. Liggett, R. Goswami, D. Stefoski and R. Balabanov (2010). "Central nervous system expression of interferon regulatory factor 1 regulates experimental autoimmune encephalomyelitis." J Neuroimmune Pharmacol **5**(2): 260-265.
104. Rico-Bautista, E., A. Flores-Morales and L. Fernandez-Perez (2006). "Suppressor of cytokine signaling (SOCS) 2, a protein with multiple functions." Cytokine Growth Factor Rev **17**(6): 431-439.

105. Rigato, C., R. Buckinx, H. Le-Corronc, J. M. Rigo and P. Legendre (2011). "Pattern of invasion of the embryonic mouse spinal cord by microglial cells at the time of the onset of functional neuronal networks." Glia **59**(4): 675-695.
106. Rodrigues, D. H., N. Lacerda-Queiroz, A. S. de Miranda, C. T. Fagundes, R. D. Campos, R. E. Arantes, C. Vilela Mde, M. A. Rachid, M. M. Teixeira and A. L. Teixeira (2011). "Absence of PAF receptor alters cellular infiltrate but not rolling and adhesion of leukocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis." Brain Res **1385**: 298-306.
107. Rudick, R. A., D. Miller, S. Hass, M. Hutchinson, P. A. Calabresi, C. Confavreux, S. L. Galetta, G. Giovannoni, E. Havrdova, L. Kappos, F. D. Lublin, D. H. Miller, P. W. O'Connor, J. T. Phillips, C. H. Polman, E. W. Radue, W. H. Stuart, A. Wajgt, B. Weinstock-Guttman, D. R. Wynn, F. Lynn, M. A. Panzara, Affirm and S. Investigators (2007). "Health-related quality of life in multiple sclerosis: effects of natalizumab." Ann Neurol **62**(4): 335-346.
108. Rudick, R. A. and A. Sandrock (2004). "Natalizumab: alpha 4-integrin antagonist selective adhesion molecule inhibitors for MS." Expert Rev Neurother **4**(4): 571-580.
109. Sawcer, S. and G. Hellenthal (2011). "The major histocompatibility complex and multiple sclerosis: a smoking gun?" Brain **134**(Pt 3): 638-640.
110. Schmidt, J. V., G. H. Su, J. K. Reddy, M. C. Simon and C. A. Bradfield (1996). "Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(13): 6731-6736.
111. Scott, H. J., M. J. Stebbing, C. E. Walters, S. McLenachan, M. I. Ransome, N. R. Nichols and A. M. Turnley (2006). "Differential effects of SOCS2 on neuronal differentiation and morphology." Brain Res **1067**(1): 138-145.
112. Simpson, S., Jr., L. Blizzard, P. Otahal, I. Van der Mei and B. Taylor (2011). "Latitude is significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis: a meta-analysis." J Neurol Neurosurg Psychiatry **82**(10): 1132-1141.
113. Soshilov, A. and M. S. Denison (2011). "Ligand displaces heat shock protein 90 from overlapping binding sites within the aryl hydrocarbon receptor ligand-binding domain." J Biol Chem **286**(40): 35275-35282.

114. Stromnes, I. M., L. M. Cerretti, D. Liggitt, R. A. Harris and J. M. Goverman (2008). "Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T(H)1 and T(H)17 cells." Nat Med **14**(3): 337-342.
115. Stys, P. K. (2013). "Pathoetiology of multiple sclerosis: are we barking up the wrong tree?" F1000Prime Rep **5**: 20.
116. Sugimoto, N., T. Oida, K. Hirota, K. Nakamura, T. Nomura, T. Uchiyama and S. Sakaguchi (2006). "Foxp3-dependent and -independent molecules specific for CD25+CD4+ natural regulatory T cells revealed by DNA microarray analysis." Int Immunol **18**(8): 1197-1209.
117. Svejgaard, A. (2008). "The immunogenetics of multiple sclerosis." Immunogenetics **60**(6): 275-286.
118. Szabo, G. and J. Petrasek (2015). "Inflammasome activation and function in liver disease." Nat Rev Gastroenterol Hepatol **12**(7): 387-400.
119. Tada, Y., A. Ho, T. Matsuyama and T. W. Mak (1997). "Reduced incidence and severity of antigen-induced autoimmune diseases in mice lacking interferon regulatory factor-1." J Exp Med **185**(2): 231-238.
120. Takeuchi, O. and S. Akira (2010). "Pattern recognition receptors and inflammation." Cell **140**(6): 805-820.
121. Tan, M. S., J. T. Yu, T. Jiang, X. C. Zhu, H. F. Wang, W. Zhang, Y. L. Wang, W. Jiang and L. Tan (2013). "NLRP3 polymorphisms are associated with late-onset Alzheimer's disease in Han Chinese." J Neuroimmunol **265**(1-2): 91-95.
122. Tannahill, G. M., J. Elliott, A. C. Barry, L. Hibbert, N. A. Cacalano and J. A. Johnston (2005). "SOCS2 can enhance interleukin-2 (IL-2) and IL-3 signaling by accelerating SOCS3 degradation." Mol Cell Biol **25**(20): 9115-9126.
123. Ting, J. P., S. B. Willingham and D. T. Bergstralh (2008). "NLRs at the intersection of cell death and immunity." Nat Rev Immunol **8**(5): 372-379.
124. Tschopp, J. and K. Schroder (2010). "NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production?" Nat Rev Immunol **10**(3): 210-215.
125. Tuohy, V. K., M. Yu, L. Yin, J. A. Kawczak, J. M. Johnson, P. M. Mathisen, B. Weinstock-Guttman and R. P. Kinkel (1998). "The epitope spreading cascade

- during progression of experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis." Immunol Rev **164**: 93-100.
126. Turnley, A. M., C. H. Faux, R. L. Rietze, J. R. Coonan and P. F. Bartlett (2002). "Suppressor of cytokine signaling 2 regulates neuronal differentiation by inhibiting growth hormone signaling." Nat Neurosci **5**(11): 1155-1162.
127. Veldhoen, M., K. Hirota, A. M. Westendorf, J. Buer, L. Dumoutier, J. C. Renaud and B. Stockinger (2008). "The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins." Nature **453**(7191): 106-109.
128. Vidal-Jordana, A., J. Sastre-Garriga, A. Rovira and X. Montalban (2015). "Treating relapsing-remitting multiple sclerosis: therapy effects on brain atrophy." J Neurol.
129. Vidal, O. M., R. Merino, E. Rico-Bautista, L. Fernandez-Perez, D. J. Chia, J. Woelfle, M. Ono, B. Lenhard, G. Norstedt, P. Rotwein and A. Flores-Morales (2007). "In vivo transcript profiling and phylogenetic analysis identifies suppressor of cytokine signaling 2 as a direct signal transducer and activator of transcription 5b target in liver." Mol Endocrinol **21**(1): 293-311.
130. Villares, R., V. Cadenas, M. Lozano, L. Almonacid, A. Zaballos, A. C. Martinez and R. Varona (2009). "CCR6 regulates EAE pathogenesis by controlling regulatory CD4+ T-cell recruitment to target tissues." Eur J Immunol **39**(6): 1671-1681.
131. Walsh, K. P., M. T. Brady, C. M. Finlay, L. Boon and K. H. Mills (2009). "Infection with a helminth parasite attenuates autoimmunity through TGF-beta-mediated suppression of Th17 and Th1 responses." J Immunol **183**(3): 1577-1586.
132. Whitney, L. W., S. K. Ludwin, H. F. McFarland and W. E. Biddison (2001). "Microarray analysis of gene expression in multiple sclerosis and EAE identifies 5-lipoxygenase as a component of inflammatory lesions." J Neuroimmunol **121**(1-2): 40-48.
133. Woelfle, J. and P. Rotwein (2004). "In vivo regulation of growth hormone-stimulated gene transcription by STAT5b." Am J Physiol Endocrinol Metab **286**(3): E393-401.
134. Yong, V. W., S. Chabot, O. Stuve and G. Williams (1998). "Interferon beta in the treatment of multiple sclerosis: mechanisms of action." Neurology **51**(3): 682-689.

135. Yoshimura, A., T. Naka and M. Kubo (2007). "SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation." Nat Rev Immunol **7**(6): 454-465.
136. Zamanian, J. L., L. Xu, L. C. Foo, N. Nouri, L. Zhou, R. G. Giffard and B. A. Barres (2012). "Genomic analysis of reactive astrogliosis." J Neurosci **32**(18): 6391-6410.
137. Zhang, Y., L. Liu, Y. L. Peng, Y. Z. Liu, T. Y. Wu, X. L. Shen, J. R. Zhou, D. Y. Sun, A. J. Huang, X. Wang, Y. X. Wang and C. L. Jiang (2014). "Involvement of inflammasome activation in lipopolysaccharide-induced mice depressive-like behaviors." CNS Neurosci Ther **20**(2): 119-124.