

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia**

Mauro Andrade de Freitas Guimarães

**EFEITOS DO *LACTOCOCCUS LACTIS* PRODUTOR DE HSP65 NA MEDULA  
ESPINHAL DE CAMUNDONGOS COM ENCEFALOMIELEITE AUTOIMUNE  
EXPERIMENTAL**

Belo Horizonte

2013

Mauro Andrade de Freitas Guimarães

**EFEITOS DO *LACTOCOCCUS LACTIS* PRODUTOR DE HSP65 NA MEDULA  
ESPINHAL DE CAMUNDONGOS COM ENCEFALOMIELITE AUTOIMUNE  
EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de mestre.

Orientadora: Dra. Ana Maria Caetano de Faria

Co-orientador: Rafael Machado Rezende

Belo Horizonte

2013

043

Guimarães, Mauro Andrade de Freitas.

Efeitos do *lactococcus lactis* produtor de hsp65 na medula espinhal de camundongos com encefalomielite autoimune experimental [manuscrito] / Mauro Andrade de Freitas Guimarães. – 2013.

85 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Ana Maria Caetano de Faria. Co-orientador: Rafael Machado Rezende.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e Imunologia. 2. Esclerose Múltipla. 3. Movimento Celular. 4. Linfócitos T Reguladores. 5. Quimiocinas. 6. Integrinas. I. Faria, Ana Maria Caetano de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais -  
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG  
 Av. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha  
 31270-901 - Belo Horizonte - MG  
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3499-2615



**ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE MAURO ANDRADE DE FREITAS GUIMARÃES.** Aos cinco dias do mês de fevereiro de 2013 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado “Efeitos do *Lactococcus lactis* produtor de hsp65 na medula espinhal de camundongos com encefalomielite autoimune experimental” requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Imunologia. Abrindo a sessão a Presidente da Comissão Profa. Ana Maria Caetano de Faria da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a argüição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Claudia Rocha Carvalho da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovado; Dr. Helton da Costa Santiago da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovado; Dra. Ana Maria Caetano de Faria da Universidade Federal de Minas Gerais, orientadora, aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado APROVADO. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 5 de fevereiro de 2013.

Dra. Cláudia Rocha Carvalho - UFMG

Dr. Helton da Costa Santiago - UFMG

Dr. Ana Maria Caetano de Faria - orientadora - UFMG

*Cláudia Rocha Carvalho*  
*Helton da Costa Santiago*  
 Prof.<sup>a</sup> Maria Elend de Lima Perez Garcia  
 Coordenadora do Curso de Pós Graduação  
 em Bioquímica e Imunologia  
 ICB - UFMG

*Anamariacatania*

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

## **Agradecimentos**

*Agradeço à minha família que desde sempre me apoiou na realização dos meus estudos, e pela compreensão e respeito que ela sempre teve pela profissão de pesquisador.*

*À minha orientadora, Ana Maria. Por fazer do LIB um ambiente diferenciado, propício às amizades e interações entre as pessoas; ao diálogo constante sobre a ciência e sobre uma nova visão da imunologia (herança dos tempos de Nelson Vaz!); e ao auxílio intelectual e inúmeras orientações que me foram concedidas, desde a época de iniciação científica até a escrita desta dissertação.*

*Ao Rafael Rezende, mais do que um co-orientador, um amigo. Muito obrigado por todo o apoio, pela presença e ajuda diária que me foi dada no laboratório, e mesmo à distância, após a mudança para os Estados Unidos.*

*Muito obrigado aos meus colegas de laboratório! São muitos, e cada um ajudou à sua maneira. À Ana Cristina, uma referência de pessoa para mim, quase uma irmã mais velha, pelas inúmeras conversas e por resolver todos os meus problemas com uma boa gargalhada! Ao Rafael Pires, que simplesmente esteve presente em todos os momentos em que eu precisei. À Thaís, uma das primeiras pessoas que me ajudou logo quando entrei para o laboratório. À Samara, que participou de todos os meus experimentos, sempre com a ajuda necessária com o Percoll e imunização. Aos alunos de iniciação científica que sempre me ajudaram, principalmente a Flávia (que galgou outros rumos na vida profissional), e a Natália, minha colaboradora no projeto da EAE!*

*Aos mais novos no LIB, também manifesto meus sinceros agradecimentos. Á Dani, que chegou de mansinho e aos poucos tornou-se uma pessoa essencial no laboratório e nos meus experimentos. Á nossa nova pós-doutoranda, Juliana, pelo companheirismo e ajuda nos trabalhos. Ao Guilherme pela contribuição nos experimentos, à Carmen Zita, pelas conversas e momentos de descontração. Á Gabi, que em pouco tempo tornou-se uma amiga!*

*Agradeço também às alunos de iniciação científica, Laila, Isabela, Mari e Luísa, que realizam ótimos trabalhos no laboratório, e me ajudaram em inúmeros experimentos. E, à Adna, uma pessoa que se tornou especial para mim, e que fez com que esse momento (e outros) fosse muito mais feliz.*

*Em especial, agradeço àquelas pessoas que trabalham no LIB, deixando em condições ideais para a pesquisa. Á Ildinha, que há tanto tempo cuida do nosso biotério, ao Jonathan, seu mais novo ajudante; e à Dona Carminha, que com seu bom humor de sempre deixa o LIB em ordem!*

*Referencio também nossos colaboradores, de fundamental auxílio para este trabalho. Professores Anderson Miyoshi e Denise Carmona; doutoranda Sylvia Amaral, pela ajuda na intravital.*

*Aos professores e funcionários do departamento de Bioquímica e Imunologia.*

*Ao CNPq pela bolsa concedida.*

## RESUMO

A esclerose múltipla é uma doença autoimune em que a operação desregulada no sistema imune do indivíduo, normalmente mediada por fatores genéticos e influenciada pelo meio ambiente, faz com que as células do sistema nervoso central sejam alvo de destruição por células inflamatórias. A esclerose múltipla é estudada por um modelo chamado de encefalomielite autoimune experimental (EAE), no qual a imunização com antígenos presentes na bainha de mielina induz uma resposta imune específica e causa assim manifestações semelhantes às da doença em humanos. Utilizando conceitos da tolerância oral, que preconiza que a ingestão contínua e em baixas doses de um determinado antígeno protéico resulta em tolerância imunológica, e das propriedades imunomodulatórias das proteínas de choque térmico (HSPs), realizamos um estudo para entendermos melhor a ação da administração oral da bactéria *Lactococcus lactis* produtor de HSP65 na prevenção da EAE. Em estudos anteriores, nosso grupo comprovou a eficiência desse mecanismo preventivo e estudou diversos parâmetros nos órgãos linfóides secundários. Neste trabalho, focamos as análises na medula espinhal e migração celular. Após 5 dias de tratamento oral por *L.lactis* produtor de HSP65 (grupo HSP65+EAE) ou apenas água para controle (água+EAE), camundongos C57BL/6 foram imunizados com MOG juntamente com CFA para a indução da doença. Nos dias 4, 10 e 14 após a imunização, os animais foram sacrificados. Observamos que, no 14<sup>o</sup> dia (período em que o índice clínico do grupo água+EAE fica mais alto), houve redução do infiltrado inflamatório e das áreas de lesão na medula espinhal apenas dos animais do grupo HSP65+EAE. Um estudo dos linfócitos reguladores T CD4<sup>+</sup> demonstrou que, neste mesmo momento, uma maior frequência das células Foxp3<sup>-</sup>LAP<sup>+</sup> ocorre no grupo HSP65+EAE. Esse resultado aponta para uma maior importância desse fenótipo celular na prevenção da EAE. Quanto aos parâmetros relativos à migração celular, estudamos, no 4<sup>o</sup> dia da indução da EAE, os receptores de quimiocinas CCR6 e CXCR3, que contribuem, respectivamente, para a indução e supressão da doença. Eles foram analisados no baço e linfonodos mesentérico e inguinal. Observamos, em linhas gerais, uma redução da frequência das células efectoras expressando CCR6 e aumento da frequência das que expressam CXCR3, no grupo HSP65+EAE. Foram

analisadas também, no 14<sup>o</sup> dia, as integrinas  $\alpha 4\beta 1$  e  $\alpha L\beta 2$ , ambas importantes para o desencadeamento da doença. Observamos uma redução da frequência de linfócitos T CD4<sup>+</sup> efetores expressando  $\alpha 4\beta 1$  no baço. A análise desses resultados demonstra muitos efeitos resultantes da ingestão do *L.lactis* produtor de HSP65, na medula espinhal de camundongos, que podem estar envolvidos com a prevenção da EAE. Embora com este trabalho ainda não se possa definir o mecanismo, as possibilidades apresentadas são plausíveis e devem ser mais estudadas.

Palavras chave: esclerose múltipla, tolerância oral, HSP65, migração celular, células T reguladoras, quimiocinas, integrinas

## ABSTRACT

Multiple sclerosis is an autoimmune disease associated with a dysfunctional operation of the immune system of an individual. This is usually mediated by genetic factors and influenced by environmental, and leads to destruction of target cells of the central nervous system by inflammatory cells. Multiple sclerosis is studied by a model called experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in which an immunization with antigens derived from the myelin sheath induces a specific immune response inducing disease manifestations similar to those in humans. Using the strategy of oral tolerance induced by the continuous intake of a specific antigen protein in low doses, and the immunomodulatory properties of heat shock proteins, we conducted a study to better understand the effect of the continuous feeding of HSP65-producing *Lactococcus lactis* in preventing EAE. In previous studies, our group has confirmed the efficacy of this modulatory mechanism and studied various immunological parameters in secondary lymphoid organs. Herein, we focused the analysis in the events taking place at the spinal cord and in cell migration. After 5 days of oral treatment with either HSP65-producing *L.lactis* (HSP65+EAE) or water only as a control (water + EAE), C57BL / 6 mice were immunized with MOG and CFA for disease induction. On days 4, 10 and 14 after immunization, animals were killed. We observed a decreased in inflammatory infiltrated and injured areas on spinal cord 14 days after the immunization (time point of the highest clinical score of EAE) only in HSP65 + EAE group. A study of regulatory CD4<sup>+</sup> T lymphocytes showed that, at this time point, a higher frequency of Foxp3<sup>-</sup> LAP<sup>+</sup> cells occurs in HSP65 + EAE group. This result indicates a greater importance of this cellular phenotype in preventing EAE. Regarding the parameters related to cell migration studied in the 4th day after EAE induction, we studied the chemokines receptors CCR6 and CXCR3, which contribute to the induction and suppression of disease, respectively. They were analyzed in the spleen, mesenteric and inguinal lymph nodes. In general, we observed a reduced frequency of effector cells expressing CCR6 and an increased frequency of T cells expressing CXCR3 in HSP65 + EAE group. We also evaluate, on the 14th day, the integrins  $\alpha 4\beta 1$  and  $\alpha L\beta 2$ , both important for disease induction. We observed a reduction in the frequency of CD4<sup>+</sup> effector T lymphocytes expressing

$\alpha 4\beta 1$  in spleen. Analysis of these results suggests that ingestion of *L.lactis* producing of HSP65 leads to many effects in the spinal cord of mice, which may be involved in the prevention of EAE. Although this work cannot define the mechanism of HSP65 effect yet, the possibilities presented are plausible and should be further studied.

Keywords: multiple sclerosis, oral tolerance, HSP65, cell migration, regulatory T cells, chemokines, integrins

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Expressão dos receptores de quimiocinas pelas células dos órgãos linfóides secundários.....60

Tabela 2: Expressão das integrinas pelas células dos órgãos linfóides secundários.....63

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenho experimental.....	40
Figura 2: Efeito do <i>L.lactis</i> produtor de HSP65 no desenvolvimento da EAE.....	46
Figura 3: Efeito da administração do <i>L.lactis</i> produtor de HSP65 no infiltrado celular da medula espinhal de camundongos com EAE.....	48
Figura 4: Efeito da administração de <i>L.lactis</i> produtor de HSP65 no número de células na medula espinhal em diferentes dias após a imunização.....	50
Figura 5: Quantificação da migração e aderência celular por microscopia intravital.....	51
Figura 6: Efeito da administração do <i>L.lactis</i> produtor de HSP65 na frequência de células T reguladoras na medula espinhal.....	53
Figura 7: Estudo do fenótipo das células T reguladoras na medula espinhal.....	55
Figura 8: Frequência de células expressando receptores de quimiocinas nos órgãos linfóides secundários.....	58
Figura 9: Estudo da expressão de integrinas em células de órgãos linfóides secundários durante a EAE.....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS

AIRE: *Autoimmune regulator*

APC: Célula apresentadora de antígeno (*antigen presenting cells*)

APRIL: *A proliferation-inducing ligand*

ATP: Adenosina tri-fosfato

CD: Grupo de diferenciação (*cluster of differentiation*)

CTLA-4: *Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*

DC: Célula dendrítica (*dendritic cell*)

EAE: Encefalomielite autoimune experimental (experimental autoimmune encephalomyelitis)

EBNA: Epstein-Barr *nuclear antigen*

Foxp3: *Forkhead box P3*

GALT: Tecido linfóide associado ao intestino (*gut associated lymphoid tissue*)

HLA: Antígeno leucocitário humano (*leukocyte antigen*)

HSP: Proteína de choque térmico (*heat shock protein*)

ICAM: *intercellular adhesion molecule*

IEL: Linfócitos intraepiteliais (*intraepithelial lymphocytes*)

IFN: Interferon

IL: Interleucina

iT<sub>reg</sub>: Linfócito T regulador induzido

Kg: Quilos

LAP: Peptídeo associado à latência (*latency associated peptide*)

LFA-1: *Lymphocyte function-associated antigen-1*

MAG: *Myelin associated glycoprotein*

MHC: Complexo principal de histocompatibilidade (*major histocompatibility complex*)

MOG: *Myelin oligodendrocyte glycoprotein*

NK: *Natural killer*

nT<sub>reg</sub>: Linfócito T regulador natural

OVA: Ovoalbumina

PLP: *Proteolipid protein*

RA: Ácido retinóico (*retinoic acid*)

slga: IgA secretória

TCR: Receptor de célula T (*T cell receptor*)

TGF- $\beta$  -Fator- $\beta$  de transformação do crescimento (*transforming growth factor- $\beta$* )

Th: Linfócito T auxiliar (*T helper*)

TLR: *Toll like receptor*

TNF- $\alpha$ : Fator-  $\alpha$  de necrose tumoral (*tumor necrosis factor –  $\alpha$* )

T<sub>reg</sub>: Linfócito T regulador

VLA-4: *Very late antigen-4*

$\mu$ g: Micrograma

mg: Miligrama

ml: Mililitro

ng: Nanograma

CFA: Adjuvante completo de Freund (*complete Freund adjuvant*)

$\mu$ m: Micrômetro

PBS- tampão salina fosfato

mM: milimolar

RPM: Rotações por minuto

GFP: Green fluorescent protein

FITC: Fluoresceína

PE: Ficoeritrina

Cy5: Cy-chrome

BSA: Albumina bovina sérica

APC: Alofocianina

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
1.1 Etiologia.....	20
1.2 Aspectos clínicos.....	22
1.3 Tratamento.....	22
1.4 Patogênese.....	24
1.5 Aspectos imunológicos.....	26
1.6 A encefalomielite autoimune experimental.....	31
1.7 Tolerância oral.....	33
1.8 Proteínas de choque térmico.....	35
1.9 Justificativa.....	37
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>39</b>
2.1 Objetivo geral.....	39
2.2 Objetivos específicos.....	39
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>40</b>
3.1 Animais.....	40
3.2 Desenho experimental.....	40
3.3 Obtenção das linhagens bacteriana.....	41
3.4 Crescimento das cepas e indução da expressão do plasmídeo.....	41
3.5 Administração do <i>Lactococcus lactis</i> por via oral.....	41
3.6 Indução da encefalomielite autoimune experimental.....	42
3.7 Índice macroscópico.....	42
3.8 Histologia.....	43
3.9 Extração de células para citometria de fluxo.....	43
3.10 Obtenção de células mononucleares da medula espinhal.....	43
3.11 Citometria de fluxo.....	44
3.12 Microscopia intravital.....	45

3.13 Análise estatística.....	45
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>46</b>
4.1 Efeitos da administração do <i>L.lactis</i> produtor de HSP65 no desenvolvimento da EAE.....	46
4.2 Efeitos da administração do <i>L.lactis</i> produtor de HSP65 no infiltrado celular da medula espinhal de camundongos com EAE.....	47
4.3 Efeitos da administração do <i>L.lactis</i> produtor de HSP65 no número total de células e de linfócitos em diferentes pontos após a imunização.....	49
4.4 Efeito da administração do <i>L.lactis</i> produtor de HSP65 na migração de leucócitos para a medula espinhal.....	50
4.5 Efeito da administração de <i>L.lactis</i> produtor de HSP65 na frequência das células T reguladoras na medula espinhal.....	52
4.6 Estudo dos subtipos de células T reguladoras na medula espinhal.....	54
4.7 Expressão de receptores de quimiocinas nos órgãos linfóides secundários durante a EAE.....	57
4.8 Estudo da expressão de integrinas nas células T dos órgãos linfóides secundários durante a EAE.....	61
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>64</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>76</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>77</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A esclerose múltipla é uma doença autoimune, de fundo genético, que afeta o sistema nervoso central. Historicamente, foi classificada durante séculos como paraplegia, em que deteriorações neurológicas ocasionavam sintomas facilmente observáveis. Entretanto, essas manifestações poderiam abranger várias doenças, e somente na metade do século XIX a esclerose múltipla teve suas principais características distinguíveis e a nomenclatura determinada. O nome da doença designa as placas formadas por tecidos cicatriciais enrijecidos (esclerose) observadas de forma difusa no sistema nervoso central (MURAY, 2009).

As alterações patológicas causadas pela esclerose múltipla podem acometer o cérebro, medula espinhal e os nervos ópticos (PENDER; GREER, 2007). Trata-se da principal causa de incapacitação neurológica não traumática em jovens adultos da Europa e Estados Unidos. As primeiras manifestações geralmente são iniciadas entre os 20 e 30 anos, sendo o desenrolar da doença incerto, o que afeta a vida pessoal e profissional dos pacientes. A expectativa de vida é reduzida, em média, entre sete e oito anos. Metade dos pacientes com esclerose múltipla tem dificuldades para realizar atividades domésticas e cumprir obrigações profissionais dez anos após o início dos sintomas e essa mesma proporção de indivíduos torna-se incapaz de caminhar após vinte e cinco anos das primeiras manifestações (TRAPP; NAVE, 2008).

Uma das principais características que dificulta o tratamento da esclerose múltipla é o fato de que o seu progresso inicial pode ser clinicamente silencioso. Dessa forma, o diagnóstico e acompanhamento da doença necessitam de técnicas de obtenção de imagens, como a ressonância magnética, o que torna o custo muito elevado, e pode retardar o início de um tratamento adequado. O fato de a doença ser clinicamente muito heterogênea também é um fator limitante para os ensaios clínicos, pois um número muito alto de pacientes é necessário para demonstrar a eficácia dos tratamentos (TRAPP; NAVE, 2008).

Cerca de 85% dos pacientes apresentam a doença inicialmente em uma fase de surto e remissão, na qual períodos curtos de intensa inflamação são sucedidos por recuperação neuronal. Mulheres têm o dobro de probabilidade que os

homens de apresentar esse padrão. Células como linfócitos e monócitos, derivadas do sangue, conseguem penetrar a barreira hematoencefálica e chegam até o sistema nervoso central, causando um processo inflamatório que destrói a mielina, os oligodendrócitos (células que sintetizam a mielina) e os axônios. Pode haver a formação de edemas e a entrada de componentes séricos no sistema nervoso central (TRAPP; NAVE, 2008). Nessa fase, as lesões são concentradas na substância branca do cérebro e medula espinhal, sendo a inflamação o principal desencadeante das lesões (LASSMANN; BRUCK; LUCCHINETTI, 2007). Na remissão ocorre resolução da inflamação e dos edemas e a remielinização dos axônios, o que restabelece sua capacidade de condução (TRAPP; NAVE, 2008).

A quantidade de surtos e remissões é bastante variável entre os pacientes. Os surtos não costumam durar mais de um mês, e esses episódios ocorrem em média duas vezes por ano. Essa fase da doença pode durar de alguns anos a décadas (TRAPP; NAVE, 2008). É interessante salientar que o número e a gravidade dos surtos que ocorrem nessa fase podem, em parte, determinar quando a fase crônica será atingida, mas não exerce influência em sua gravidade ou progressão depois de estabelecida (LASSMANN; BRUCK; LUCCHINETTI, 2007).

Passada a etapa de surtos e remissões, a maioria dos pacientes atinge o estágio crônico da doença, conhecido como esclerose múltipla secundária progressiva, em que os danos neurológicos são contínuos e irreversíveis (TRAPP; NAVE, 2008). Nesse caso, não é mais a inflamação a única causadora das lesões. Observa-se uma atrofia difusa tanto na substância branca como na cinzenta, sendo o córtex atingido. Não são formadas novas placas inflamatórias desmielinizantes, mas aquelas já existentes sofrem um aumento gradual e lento em suas margens (LASSMANN; BRUCK; LUCCHINETTI, 2007). A fase crônica é acompanhada por um aumento da complexidade dos mecanismos causadores das lesões e da dificuldade de se estabelecer um tratamento eficiente. Estruturas semelhantes a folículos linfóides são formadas nas meninges e entre os espaços perivasculares, sendo associadas com rápida progressão da doença e danos cerebrais mais profundos. Com o decorrer do tempo, a inflamação torna-se uma variável menos relevante na doença, e os tratamentos convencionais com anti-inflamatórios tornam-se menos eficazes (FRISCHER J.M *et al*, 2009).

A esclerose múltipla primária progressiva tem a mesma prevalência entre homens e mulheres. Cerca de 15% dos pacientes apresentam esse padrão da doença. Não ocorre a fase inicial em que há períodos de remissão, pois os surtos evoluem diretamente para a fase crônica. Normalmente as manifestações clínicas ocorrem mais tardiamente, mas são mais dificilmente tratadas (TRAPP; NAVE, 2008).

### 1.1 Etiologia

A etiologia exata da esclerose múltipla ainda é desconhecida, porém sabe-se que esta possui um fundo imunogenético obrigatório, e que fatores ambientais são importantes desencadeadores da patologia. Dados epidemiológicos sustentam o fator genético da doença, visto que em certas famílias a incidência é muito maior que em outras, e que a prevalência é substancialmente aumentada em pessoas que possuem familiares doentes. Já a análise das variáveis geográficas é mais complexa, pois aspectos ambientais também podem estar implicados. Em certas regiões do planeta, como no norte europeu e América do Norte, a incidência é muito maior que no Japão, por exemplo (SOSPEDRA; MARTIN, 2005).

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

Quanto aos fatores ambientais envolvidos na esclerose múltipla, esses podem ser infecciosos ou não. O estudo desses parâmetros torna-se muito importante para o entendimento da etiologia da doença, visto que a genética por si só não explica diferenças quanto à incidência em grupos de pessoas com a mesma ancestralidade

que migram para a mesma região, ou a redução do risco em pessoas que migram para regiões com menor incidência, dentre outros aspectos (ASCHERIO; MUNGER, 2007a).

Dos aspectos relativos às infecções, a “Hipótese da Higiene” é utilizada como tentativa de explicar o fato de que em locais de maiores latitudes a incidência é maior que em locais de menores latitudes, partindo do princípio que esses últimos costumam ter maior índice de pobreza, e seus habitantes são expostos a uma vasta gama de microorganismos quando jovens. O estímulo precoce do sistema imune no sentido de gerar mecanismos imuno-reguladores anti-inflamatórios faz com que esses indivíduos tenham menor probabilidade de apresentarem doenças inflamatórias crônicas tais como alergias e doenças autoimunes quando adultos (BACH, 2005; FLEMING; COOK, 2006). Entretanto, essa teoria tem algumas limitações, pois é improvável que todos os microorganismos e parasitas tenham a mesma influência quanto ao desencadeamento da doença. Atualmente, sabe-se que alguns têm efeito mais protetor, enquanto outros têm efeito promotor da doença. Um dos casos mais estudados, e que contrapõe a hipótese da higiene, é o do vírus Epstein-Barr. Indivíduos soronegativos para esse vírus (ou seja, que não foram expostos ao patógeno, principalmente na infância) têm uma probabilidade bem menor de desenvolver a esclerose múltipla. É justamente a resposta imunológica gerada pela infecção com esse vírus a possível responsável pelo desencadeamento da doença. Anticorpos específicos para o vírus Epstein-Barr são comumente encontrados em grande número nos indivíduos soro-positivos cerca de cinco anos antes do início da esclerose múltipla. Além disso, linfócitos T específicos para o antígeno nuclear desse vírus (EBNA, Epstein-Barr *nuclear antigen*) são encontrados em maior quantidade nos pacientes com a doença autoimune (ASCHERIO; MUNGER, 2007a).

Dentre os fatores ambientais não relacionados às infecções, um dos mais estudados é a exposição à luz solar, a qual é importante para a síntese da vitamina D no organismo. Tanto em estudos experimentais em animais, quanto epidemiológicos em humanos, essa vitamina é relatada como tendo efeito protetor para a esclerose múltipla, principalmente quanto à sua prevenção. O hábito de fumar também pode aumentar o risco para a doença, além de acelerar a transição da fase

de surto-remissão para a secundária progressiva. Isso pode ser devido a sua ação neurotóxica, ou até mesmo efeitos imunológicos, visto que o cigarro também aumenta o risco para outras doenças autoimunes. A baixa ingestão de gorduras poliinsaturadas em detrimento das saturadas e a baixa ingestão de alimentos antioxidantes também podem ser fatores de risco, porém estudos sobre a influência da alimentação ainda são emergentes e pouco conclusivos (ASCHERIO; MUNGER, 2007b).

## **1.2 Aspectos clínicos**

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

Não existem testes específicos que diagnosticam a esclerose múltipla. A doença é distinguível principalmente por padrões clínicos. É necessário que se observe lesões em, no mínimo, dois sítios distintos do sistema nervoso central, e que o paciente já tenha tido ao menos dois episódios de manifestações neurológicas típicas da esclerose múltipla. O diagnóstico inicial da doença é muito mais complexo do que o acompanhamento clínico de um paciente com a doença já diagnosticada (McDONALD; RON, 1999).

## **1.3 Tratamento**

O tratamento da esclerose múltipla é complexo, sendo que o próprio conceito de cura para essa doença difere de outros como no caso do câncer ou doenças infecciosas. Por ser uma doença autoimune, de fundo genético, a cura pode ser considerada como a ausência das características típicas da patologia, mas não um

restabelecimento da normalidade do sistema imune, pois esse possui uma alteração inerente ao seu funcionamento (WEINER, 2009).

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

Das drogas usadas no tratamento da esclerose múltipla destacam-se as imunomodulatórias e as imunossupressoras. No primeiro grupo, uma das mais administradas é o interferon- $\beta$ , que já foi demonstrado como eficiente em reduzir os relapsos, o agravamento dos sintomas e a progressão da doença. Parece atuar reduzindo a proliferação dos linfócitos T, a produção de citocinas pró-inflamatórias e aumentando a produção de citocinas anti-inflamatórias. O acetato de glatirâmer, um polímero de aminoácidos, também parece polarizar a resposta imune para um perfil mais regulador, além de promover uma inibição específica nos linfócitos T reativos a antígenos da bainha de mielina. Já o Natalizumab e o Alemtuzumab são anticorpos monoclonais humanizados. Enquanto o primeiro depleta uma molécula importante para a adesão dos leucócitos ao vaso e conseqüente entrada na barreira hematoencefálica, o último causa uma completa depleção das células que carregam sua molécula alvo, que podem ser linfócitos B e T, macrófagos, monócitos, células dendríticas, NK (*natural killer*) e granulócitos, com exceção dos neutrófilos. É importante ressaltar que todas essas drogas têm efeitos colaterais, desde inflamações no local da aplicação até alterações metabólicas importantes e manifestações clínicas, como taquicardia e trombocitopenia (LOMA; HEYMAN, 2011).

O grupo das drogas imunossupressoras é aquele em que os efeitos colaterais são mais graves, como menor resistência às infecções e surgimento de neoplasias. Por isso, não são as mais aceitas para o tratamento. A mitoxantrona e a ciclofosfamida causam uma imunossupressão generalizada no indivíduo, além de ter

alguns efeitos específicos, como inibição da migração de linfócitos e monócitos e polarização para resposta Th2, respectivamente. Atualmente as drogas padrão para o tratamento da esclerose múltipla na fase inicial são do grupo dos corticoesteróides. Seus efeitos em prazos mais longos ainda não são muito claros. Atuam inibindo a proliferação de linfócitos e a síntese de citocinas pró-inflamatórias (LOMA; HEYMAN, 2011).

As pesquisas mais recentes que visam o desenvolvimento de novas terapias para a esclerose múltipla têm focado em tratamentos por via oral. Um exemplo é a administração de fingolimod, um modulador do receptor da esfingosina 1-fosfato. Este composto atua prevenindo o egresso de linfócitos dos linfonodos, impedindo que os potencialmente agressivos cheguem ao sistema nervoso central. Os testes em humanos demonstram resultados positivos e com poucos efeitos colaterais na fase inicial da doença, enquanto os efeitos em longo prazo são mais desconhecidos (KAPPOS *et al*, 2010).

#### **1.4. Patogênese**

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

É importante ressaltar que ainda é desconhecido se ocorre uma resposta imune específica para o axônio. Anticorpos com especificidade para proteínas axonais não são encontradas no líquido cefalorraquidiano e no soro de pacientes, mas os para o axolema (membrana que reveste o axônio) podem ser detectados.

Além disso, como muitos axônios sobrevivem à etapa da inflamação aguda é pouco provável que a inflamação seja específica (DUTTA; TRAPP, 2007).

Danos e perdas de axônios são observados também na fase progressiva da doença, em neurônios desmielinizados, mesmo na ausência de um processo inflamatório. Ao contrário da fase aguda, na fase crônica, o sistema nervoso central já não possui mais uma capacidade renovatória significativa, e os sintomas são mais severos. Acontece, portanto, uma contínua atrofia do sistema nervoso central e perdas axonais, independentemente de inflamação. É interessante salientar que as perdas axonais não são apenas relacionadas à ausência da mielina, mas também à carência de fatores tróficos importantes (DUTTA; TRAPP, 2007; BJARTMAR; YIN; TRAPP, 1999). Em modelos animais, a ausência da proteína MAG (*myelin associated glycoprotein*), embora não impeça a formação da mielina, causa uma atrofia progressiva do axônio na quinta semana de vida do camundongo (Yin, X *et al*, 1998), semelhantemente à ausência da PLP (*Proteolipid protein*), em que os efeitos são observados mais tardiamente (GRIFFITHS, I *et al*, 1998).

O efeito prejudicial da desmielinização no axônio é provavelmente devido às alterações em diversos aspectos fisiológicos, como no transporte de íons. Com a desmielinização, ocorre uma redistribuição dos canais de sódio ao longo do neurônio, aumentando a demanda por enzimas do tipo ATPases, responsáveis por manter um gradiente iônico equilibrado no axônio. Quando o ATP gerado já não é suficiente para a manutenção dessas enzimas, a concentração de sódio no axoplasma é aumentada, e conseqüentemente a de cálcio também. As enzimas dependentes desse íon, portanto, causam danos ao axônio, como despolimerização dos microtúbulos e fragmentação dos neurofilamentos (DUTTA; TRAPP, 2007).

Embora a esclerose múltipla seja uma doença comumente associada ao acometimento da substância branca, alguns de seus sintomas, como danos cognitivos específicos, são explicados por alterações patológicas na substância cinzenta. Sabe-se que esta é afetada de uma maneira bem diferente da substância branca, pois o componente inflamatório é bem menos significativo, e nas fases iniciais da doença ela ainda é pouco acometida. Ainda não se sabe ao certo o que de fato desencadeia os danos à substância cinzenta. Uma possibilidade é que ela ocorra como conseqüência da inflamação da substância branca, que resulta em

carência energética para os neurônios e eliminação de substâncias potencialmente lesivas, o que, por fim, pode danificar também a substância cinzenta. Pode também ocorrer após inflamação nas meninges. Nesse caso, a substância cinzenta é primariamente envolvida na patofisiologia da doença (não havendo a necessidade de um processo inflamatório na substância branca). A inflamação das meninges pode levar à desmielinização da camada cortical subpial como efeito colateral (GEURTS; BARKHOF, 2008).

### **1.5 Aspectos imunológicos**

A esclerose múltipla é uma doença autoimune, na qual uma resposta imune desregulada e influenciada fatores genéticos e ambientais (citados anteriormente) é responsável pelos danos ao sistema nervoso central. Na fase inicial, os danos à substância branca são gerados por um processo inflamatório. O infiltrado inflamatório local contém diversos tipos celulares, como macrófagos, linfócitos B e T, células da micróglia ativadas, entre outras (PENDER; GREER, 2007).

Normalmente a esclerose múltipla inicia-se com uma lesão aguda causada por linfócitos T CD4<sup>+</sup>, cujos receptores (TCR) são específicos para determinados antígenos da bainha de mielina. Eles chegam ao sistema nervoso central oriundos da periferia, onde foram estimulados por células apresentadoras de antígenos. Tais linfócitos são geralmente descritos como sendo Th1, secretores de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Porém, a importância dada às células Th17 tem aumentado nos últimos anos, visto que esse subtipo de linfócito tem sido encontrado no sistema nervoso central dos pacientes com a doença (WEINER, 2009). Esses linfócitos produzem a citocina IL-17 (interleucina 17), e a proporção deles relativa à das células Th1 determina em grande parte o perfil da doença. Em modelos animais, foi visto que esses tipos celulares atuam de maneira semelhante nas lesões da medula espinhal. Em contrapartida, um perfil celular Th17 é importante para o infiltrado inflamatório chegar ao parênquima cerebral, e não ficar restrito às meninges (STROMNES et al, 2008).

A relevância das células T CD4<sup>+</sup> no desencadeamento da doença é consistente com o risco genético relativo ao HLA de classe II, já descrito anteriormente. As células apresentadoras de antígeno (APCs, *antigen presenting*

*cells*) possuidoras do MHC de classe II apresentam epitopos protéicos para os linfócitos T auxiliares (Th). As células dendríticas (DCs), as APCs profissionais, atuam modulando o fenótipo dos linfócitos T virgens (*naive*, aqueles que ainda não foram ativados), além de estimular as células T efetoras a proliferarem e responderem aos seus antígenos específicos (McFARLAND; MARTIN, 2007). O próprio fenótipo da célula dendrítica também é importante para definir sua maneira de atuação. As DCs mielóides, através da secreção de TGF- $\beta$  (transforming growth factor- beta) e IL-6 (ou IL-23), polarizam a diferenciação dos linfócitos T CD4+ *naive* para um perfil Th17 (BAILEY *et al*, 2007 ), enquanto as DCs plasmocitóides têm um potencial estimulador menor, e ainda podem impedir a produção de citocinas inflamatórias pelos linfócitos T, atuando, portanto, de maneira reguladora (BAILEY-BUCKTROUT, 2008). Um tipo celular típico do sistema nervoso central que também tem função apresentadora de antígenos é a micróglia. Em condições fisiológicas, essas células expressam MHC-I e MHC-II em baixa intensidade, além das moléculas co-estimuladoras CD40 e CD86 em menor quantidade. Já em um contexto inflamatório, a micróglia adquire um perfil mais ativado, com aumento da capacidade fagocítica e de secreção de citocinas (YANG *et al*, 2010).

A entrada dos leucócitos no sistema nervoso central é dependente de processos que induzem a migração dessas células, e necessita que algumas barreiras sejam ultrapassadas. A mais tratada nesse caso é a hematoencefálica propriamente dita, que consiste em células endoteliais da microvasculatura circundadas pelas terminações dos pericitos e astrócitos. Também existe a barreira sangue-líquido cefalorraquidiano, um tipo de barreira hematoencefálica, mas que diferentemente da propriamente dita não possui tipos celulares específicos, mas é formada pelos complexos juncionais do epitélio do plexo coróide (ROCHA, 2008-2009). Todos esses fatores fazem com que o sistema nervoso central seja considerado um sítio “imunoprivilegiado”, termo que faz referência à capacidade dele de estabelecer uma permeabilidade seletiva, sendo necessária alguma desordem para que leucócitos cheguem até lá.

As quimiocinas e integrinas são moléculas muito importantes para a chegada das células do sangue até o sistema nervoso central. Os leucócitos circulantes precisam de algum estímulo que os tornem posicionados próximos à parede do

vaso, ao invés de serem carregados pela corrente sanguínea. Isso pode ser mediado por moléculas de adesão da família das selectinas e por integrinas específicas, como a  $\alpha 4\beta 1$  (VLA-4, *very late antigen-4*), que se liga ao receptor carboidrato VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*), e  $\alpha L\beta 2$  (LFA-1, *lymphocyte function-associated antigen-1*), ligante de receptores ICAMs (*intercellular adhesion molecules*). Esse contato inicial permite que posteriormente o leucócito role pela parede do endotélio, onde são produzidas quimiocinas que se ligam aos seus receptores nos leucócitos, ativando uma cascata de sinalização que aumenta a força de adesão dessas células à microvasculatura (ENGELHARDT, 2008; HOLMAN; KLEIN; RANHOSOFF, 2011).

O próximo passo é a migração transendotelial dos leucócitos. Esse processo pode ocorrer pela via paracelular, ou seja, entre as células endoteliais, ou através de um movimento em que o leucócito passa pela própria célula endotelial, chamado de transcelular. Fatores que determinam qual delas ocorrerá preferencialmente são diversos e muito divergentes, pois várias moléculas envolvidas na adesão e migração são encontradas tanto nas junções das células endoteliais quanto na superfície dessas células (HOLMAN; KLEIN; RANHOSOFF, 2011).

Em pacientes com esclerose múltipla, várias quimiocinas, bem como seus receptores, tem a expressão modificada. A análise de fluidos como o sangue e o líquido cefalorraquidiano e do próprio tecido nervoso permitiu observar o aumento dos níveis das quimiocinas CXCL9 e CXCL10, entre outras, no líquido cefalorraquidiano de pacientes na fase de relapso, bem como da expressão de seu receptor, CXCR3, que pode ser detectado na maioria dos linfócitos T no líquido cefalorraquidiano de pacientes com esclerose múltipla. Outras quimiocinas, como CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, são detectadas nas placas escleróticas, sendo seus ligantes CCR1, CCR3 e CCR5 encontrados em macrófagos e micróglia nos focos inflamatórios (SZCZUCINSKI; LOSY, 2007). Já o receptor de CCL20, o CCR6, é mais citado em estudos experimentais sobre a esclerose múltipla. Em humanos doentes ele é relacionado com a migração de células encefalitogênicas para o sistema nervoso central, principalmente os linfócitos do tipo Th1 (ANDALIB, A *et al* 2011).

Embora as células desencadeadoras da doença sejam do tipo Th, as alterações patológicas propriamente ditas são pouco relacionadas aos linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Outros tipos celulares têm ações efetoras capazes de ocasionar as lesões. Uma das mais bem definidas na esclerose múltipla é o linfócito T expressando CD8, chamado de citotóxico. Ele tem a frequência aumentada nas lesões ocasionadas pela doença, ultrapassando à das células T CD4<sup>+</sup>. Sua ação é dependente da secreção de perforinas e granzinas e da citocina IFN- $\gamma$ . Possui uma capacidade muito alta de proliferação sob a estimulação antígeno-específica, e é encontrada em grande quantidade nas proximidades de oligodendrócitos e axônios desmielinizados (FRIESSE; FUGGER, 2009). Outro tipo celular, o linfócito B, também é importante na doença. Em seu estado ativado, quando ele é chamado de plasmócito, é mais comum na fase crônica e, em alguns pacientes, imunoglobulinas e componentes do sistema complemento, ambos relacionados com a resposta humoral, predominam nas lesões (LASSMANN; BRUCK; LUCCHINETTI, 2007).

A imunidade inata também é muito importante para a imunopatologia da doença. A micróglia, que corresponde a cerca de 10% a 20% das células da glia, é considerada como um tipo de macrófago residente do sistema nervoso central. Essa célula promove a apresentação de antígeno e produz citocinas pró-inflamatórias, além de estar envolvida na fagocitose da mielina degradada e de promover a desmielinização de neurônios. Outras células da imunidade inata também têm relativa importância na esclerose múltipla, como as células NK (*natural killer*), linfócitos T NK, mastócitos e linfócitos T portando o TCR do tipo  $\gamma\delta$  (cujos mecanismos de ação diferem daqueles utilizados pelos linfócitos T convencionais expressando o TCR $\alpha\beta$ ) (GANDHI; LARONI; WEINER, 2010).

É importante ressaltar que existem vários mecanismos imunorreguladores no organismo que contribuem para a manutenção da homeostasia, evitando as respostas imunes desreguladas, como as causadoras dos acometimentos autoimunes. Neste estudo, os mais relevantes são os chamados processos ativos, em que é justamente uma resposta reguladora (e não a imunossupressão) a promotora da saúde para o indivíduo. Nesse contexto, destacam-se então as células conhecidas como reguladoras, principalmente os linfócitos T CD4<sup>+</sup>. O tipo mais conhecido (chamado de T<sub>reg</sub>) é a que expressa o fator de transcrição Foxp3

(*Forkhead box P3*). Este é associado com a expressão de vários genes, entre eles o da citocina anti-inflamatória IL-10, e de moléculas como CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*), um potente regulador negativo da resposta imune celular (FONTENOT *et al*, 2005). A célula T<sub>reg</sub> natural (nT<sub>reg</sub>) se diferencia no timo a partir de interações de alta avididade entre seu TCR e antígenos apresentados por MHC-II, e expressa o CD25, a cadeia  $\alpha$  do receptor da citocina IL-2.

Outro tipo de linfócito T regulador é chamado de célula T<sub>reg</sub> induzida (iT<sub>reg</sub>), gerada na periferia (órgãos linfóides secundários, mucosa intestinal e tecidos inflamados). A sua geração requer uma combinação de citocinas, como IL-2 e TGF- $\beta$ , bem como uma coestimulação adequada da molécula CTLA-4 (LAFAILLE, M.A.C; LAFAILLE, J.J, 2009). O ácido retinóico (RA), um metabólito da vitamina A produzido por células dendríticas CD103+ da mucosa intestinal, pode potencializar esse processo. Ao contrário, a presença de IL-6 em um meio rico em TGF- $\beta$  leva à indução de células com fenótipo Th17. Um ambiente rico em IL-6 e ácido retinóico favorece a geração de células T reguladoras, e não Th17 sugerindo que o RA tem a capacidade de inibir a diferenciação de linfócitos Th17 (MUCIDA, 2007; COOMBES *et al*, 2007). A vitamina D também foi descrita como potencializadora na geração dessas células reguladoras, e até mesmo como possível fator de prevenção à esclerose múltipla. A ligação desta (1,25 dihidroxi-vitamina D) ao seu receptor nuclear é capaz de modular células dendríticas que induzem a expressão de Foxp3 em linfócitos T CD4+ tornando-os capazes de atividades reguladoras (PENNA *et al*, 2005). Em concerto com esses dados, há relatos de uma correlação positiva entre os níveis de vitamina D e a atividade de células T reguladoras em pacientes com esclerose múltipla (SMOLDERS *et al*, 2009; CORREALE; YSRRAELIT; GAITÁN, 2009 ).

O grupo de Howard Weiner descreveu, há alguns anos, um novo tipo de célula T reguladora produtora preferencial de TGF- $\beta$ , denominado de Th3. As células Th3 secretam TGF- $\beta$  e, em menor proporção, IL-10 (CHEN *et al*, 1994, WEINER, 2001b). Além disto, essas células não expressam o fator de transcrição Foxp3, mas são capazes de induzir a diferenciação de células Treg CD4+CD25+Foxp3+ quando transferidas para camundongos (CARRIER *et al*, 2007). A ação imuno-reguladora da citocina TGF- $\beta$  já foi demonstrada em vários modelos experimentais de doenças e

ela tem sido implicada nos mecanismos desencadeadores da tolerância oral (FARIA; WEINER, 2006a, WEINER *et al*, 2011). Mais recentemente, Nakamura e colaboradores descreveram células T CD4+ portadoras da forma de membrana de TGF- $\beta$  e a importância dessas células na imuno-regulação da colite experimental foi demonstrada por mais de um grupo (NAKAMURA; KITANI; STROBER, 2001; OIDA *et al*, 2003). Essa célula é caracterizada pela expressão da forma latente da citocina TGF- $\beta$  em sua membrana (associada ao peptídeo LAP, *latency associated peptide*), que posteriormente tem sua porção ativa clivada e secretada para o meio. Interessantemente, as células T CD4+LAP+ também expressam a enzima capaz de clivar o LAP ativando o TGF- $\beta$  de membrana (OIDA *et al*, 2003). A ligação entre as células Th3 anteriormente descritas e o novo tipo celular expressando LAP na superfície ainda não é clara, mas tem sido proposto que as células T CD4+LAP+ seriam progenitoras das células Th3 (WEINER *et al*, 2011). Esses tipos de célula reguladora têm sua função mediada, portanto, pela secreção de citocinas tais como TGF- $\beta$  e IL-10, enquanto as T reguladoras clássicas também podem induzir inibição por contato. Além disso, as células T CD4+LAP+ podem ou não apresentar marcadores das células Treg, como CD25 e Foxp3 (OIDA *et al*, 2003).

### **1.6 A encefalomielite autoimune experimental**

A encefalomielite autoimune experimental (EAE) é o modelo mais utilizado para representar reproduzir, em várias espécies de animais, os aspectos imunopatológicos da esclerose múltipla em humanos. Entretanto, por se tratar de um modelo experimental, algumas defasagens e imperfeições existem. (HART; GRAN; WEISSERT, 2011).

Esse modelo experimental é induzido através da imunização de camundongos ou ratos com antígenos encefalitogênicos presentes na bainha de mielina, na presença de adjuvantes. O antígeno escolhido e a forma como as manifestações ocorrem dependem da linhagem do animal. Em camundongos, os dois modelos mais freqüentemente usados são o de relapso-remissão, em que a linhagem SJL é imunizada com o antígeno PLP (peptídeo 139-151 da *proteolipid protein*), e o crônico, com a imunização através da MOG (peptídeo 35-55 da *myelin oligodendrocyte glycoprotein*), em que uma fase de manifestações brandas é sucedida por um agravamento, cujo pico ocorre cerca de duas semanas após a

imunização e tem duração de alguns dias. Posteriormente uma melhora incompleta dessas manifestações é observada e essa remissão mantida por um período longo (HART; GRAN; WEISSERT, 2011).

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

É importante ressaltar que a EAE é comumente estudada em camundongos ou ratos de determinadas linhagens específicas, normalmente isogênicos (consanguíneos), e muitas vezes em condições não encontradas na natureza, como em ambientes livres de patógenos específicos. No modelo em que a MOG é utilizada na imunização de camundongos da linhagem C57BL/6, o tipo de resposta imunológica mais relevante para o desencadeamento das manifestações é a Th17. Em animais deficientes para essa citocina (IL-17), a doença é dificilmente induzida, bem como anticorpos que a bloqueiam impedem que ela seja desencadeada. Ao contrário, anticorpos bloqueadores da citocina IFN- $\gamma$ , e a deficiência de uma subunidade específica da IL-12 (ambas as citocinas são típicas de uma resposta Th1), acabam por agravar a doença. O IFN- $\gamma$  parece atuar inibindo o surgimento de células produtoras de IL-17, polarizando a resposta para um perfil Th1 (KOMIYAMA, *et al*, 2006).

Um tipo celular muito importante na EAE é o neutrófilo. Ele é recrutado pela alta produção de IL-17 durante a EAE, que induz fatores quimiotáticos importantes (STROMNES *et al*, 2008). Do período inicial da doença até o auge das manifestações, os neutrófilos vão mudando sua distribuição no sistema nervoso

central, passando das áreas perivasculares e meninges para as regiões parenquimais. Eles atuam via enzimas proteases, peptídeos antimicrobianos e radicais reativos de oxigênio liberados de seus grânulos intracelulares (WU *et al*, 2010)

### **1.7 Tolerância oral**

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

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

O tecido linfóide associado à mucosa intestinal é complexo, com órgãos linfóides secundários e células organizadas de uma maneira peculiar. No intestino,

são encontrados os linfonodos mesentéricos (os maiores do organismo). Eles fazem um intercâmbio entre o GALT e a circulação periférica e são sítios importantes para a expansão de células T reguladoras e para a indução de tolerância oral (WORBS *et al*, 2006, SCHULZ *et al*, 2009, PABST; MOWAT, 2012). Uma população interessante de células, os linfócitos intraepiteliais (IEL, intraepithelial lymphocytes), são em grande parte CD8<sup>+</sup>, e vários expressam o receptor de célula T mais incomum, o TCR  $\gamma\delta$ . Os IELs contribuem para manter a homeostasia do GALT. Aparentemente, eles podem participar tanto de fenômenos fisiológicos reguladores como a tolerância oral (KE *et al*, 1997, KAPP *et al*, 2004) como também nas respostas imunes anti-infecciosas limitando a disseminação de microorganismos (HAYDAY *et al*, 2001). Já a lâmina própria contém células B e T com uma frequência similar à encontrada nos órgãos linfóides periféricos, e esses linfócitos B, uma parte deles da subpopulação de células B1, produzem grande quantidade da imunoglobulina A secretória (sIgA) (REIS; MUCIDA, 2011; WEINER *et al*, 2011). A sIgA é produzida por células estimuladas por alguns fatores importantes, principalmente o TGF- $\beta$ . Entretanto, o óxido nítrico produzido por células dendríticas da mucosa, bem como a citocina APRIL e o ácido retinóico, também contribuem para esse processo (MORA; VON ANDRIAN, 2008).

A indução de uma resposta imune na mucosa ocorre quando os antígenos têm acesso a ela. Isso pode ocorrer através de algumas vias, como através das células M associadas às placas de Peyer (agregados linfóides macroscópicos presentes no intestino delgado), das células epiteliais colunares ou de algumas células dendríticas especializadas, que estendem suas projeções para o lúmen e capturam antígenos, sem causar danos às junções intercelulares do epitélio (WEINER *et al*, 2011).

De modo geral, diz-se que a entrada de altas doses do antígeno na mucosa induz uma tolerância mediada primariamente por anergia ou deleção, enquanto o contato com pequenas doses induz uma tolerância mais ativa, através de células T reguladoras (FARIA; WEINER, 2005). Nesse último caso, experimentos em animais têm demonstrado que a ingestão contínua de antígeno, em detrimento de ingestões únicas, periódicas ou induzidas (gavagens) é mais eficiente para a indução da tolerância oral (FARIA *et al*, 1998), como no caso da indução da tolerância à

ovalbumina (OVA) e a proteína MBP (*myelin basic protein*), em que esse mecanismo mostrou ser o mais eficiente para aumentar níveis de IL-10 e TGF- $\beta$  (FARIA *et al*, 2003)..

A tolerância oral tem sido utilizada com sucesso em diversos modelos experimentais. Em estudos sobre artrite, colite, aterosclerose e diabetes, a ingestão de determinados antígenos, justamente aqueles responsáveis por induzir uma resposta patológica (visto que são doenças autoimunes), previnem as manifestações, quando o organismo é posteriormente desafiado com esse mesmo antígeno, por outra via (FARIA; WEINER, 2006b). No caso da EAE, os primeiros resultados obtidos com sucesso foram em 1988, com o antígeno MBP, em ratos de Lewis (KHOURY *et al*, 1990; BROD, *et al* 1991). Posteriormente, outras linhagens e antígenos foram testados. No caso da MOG, sua ingestão anteriormente à imunização de camundongos C57BL/6 promove uma redução da resposta Th17, responsável pelo desencadeamento da doença, bem como de outras citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, impedindo, assim, as manifestações da EAE (PERÓN *et al*, 2010).

### **1.8 As proteínas de choque térmico**

Embora os principais antígenos alvo envolvidos no desencadeamento da resposta de linfócitos T presente na EAE e na esclerose múltipla já tenham sido descritos, existem outras moléculas importantes que são liberadas durante os eventos inflamatórios e que podem ser alvos terapêuticos importantes para o tratamento dessas doenças inflamatórias crônicas. A classe de proteínas conhecida como proteínas de choque térmico é um desses casos. As proteínas de choque térmico possuem seus genes codificantes altamente conservados sendo encontrados em todas as espécies pesquisadas até hoje. Tais genes, bem como seus produtos, são classificados em famílias de acordo com a homologia nas sequências e tamanho molecular. Portanto, as Hsps (*heat shock proteins*) são denominadas HSP 10, HSP60, HSP70, HSP90, HSP100, entre outras (FEDER; HOFMANN, 1990).

As HSPs funcionam como chaperonas moleculares, e tem sua ação aumentada em condições de estresse celular, como o aumento da temperatura, o

que justifica sua nomenclatura. Ao interagirem com proteínas que não estão apresentando sua conformação nativa, reduzem a probabilidade dessas exercerem efeitos inadequados sob outras proteínas. Esse mecanismo pode acontecer de várias maneiras, sendo as HSPs capazes de manter seus ligantes na forma dobrada ou desdobrada; participar da entrada e saída de elementos da célula; minimizar a agregação de proteínas não nativas, bem como ligar-se a proteínas não nativas ou agregados para posterior degradação e remoção da célula (FEDER; HOFMANN, 1990).

Das propriedades mais interessantes das HSPs podemos citar as envolvidas com as respostas imunológicas do organismo. A própria função de chaperona confere a essas proteínas características importantes no contexto imunológico, porque elas podem se ligar a peptídeos antigênicos produzidos no citosol e transportá-los até a fenda do MHC-I, além de promover a apresentação cruzada, em que peptídeos são levados por ela para fora da célula, e o complexo chaperona-epitopo é apresentado pelo MHC-I (TSAN; GAO, 2009).

A HSP60 é uma das proteínas de choque térmico mais estudadas, principalmente no que diz respeito a sua relação com o sistema imune. Em condições de stress, grande quantidade dela é encontrada em forma solúvel, no sangue, afetando o sistema imunológico de diversas maneiras. O HSP60 por si só é capaz de sinalizar com receptores da imunidade inata, como o TLR4 (*Toll like receptor 4*) de macrófagos, células dendríticas e monócitos, sendo que esses últimos passam por maturação e ativação após a sinalização induzida pelo HSP60, resultando na produção de citocinas pró-inflamatórias (QUINTANA; COHEN, 2010). Ao contrário, a ligação de TLR2 dos linfócitos T reguladores pela HSP60 leva ao aumento da capacidade reguladora dessas células, pois elas tornam-se mais eficientes na inibição da secreção de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  pelas células efetoras (nesse caso, consideradas como não regulatórias), e as próprias células reguladoras passam a expressar níveis mais elevados de IL-10 e TGF- $\beta$  (ZANIN-ZHOROV *et al*, 2006).

A ação das proteínas de choque térmico no sistema imune pode em parte ser explicada pelo fato delas serem antígenos imunodominantes, como proposto por Irun Cohen (COHEN; YOUNG, 1991). Através de uma teoria denominada

“Homunculus imunológico” (fazendo referência ao homunculus neurológico, em que o corpo humano é representado proporcionalmente à importância que cada parte tem para o sistema nervoso), esse autor propõe que alguns antígenos próprios seriam os principais responsáveis pela organização estrutural do sistema imunológico. Dentre tais antígenos estão, portanto, as proteínas de choque térmico, por serem altamente presentes no organismo, tanto em condições fisiológicas quanto de estresse, além de serem muito presentes no contexto de apresentação antigênica no timo. O organismo saudável, portanto, é povoado com células T e B reativas a antígenos próprios, entre eles as HSPs (COHEN, 2007). Dentre essas células, destacam-se as T reguladoras, sendo muitas delas naturais e formadas no timo. Esse processo é dependente do fator de transcrição AIRE (*autoimmune regulator*), que regula a expressão e apresentação de antígenos pelas células medulares do epitélio tímico (ASCHENBRENNER *et al*, 2007). Tais propriedades imunológicas das proteínas de choque térmico as tornaram objetos de estudos em vários modelos de doenças, principalmente as autoimunes. Resultados positivos foram alcançados em modelos de artrite, aterosclerose, asma, diabetes tipo I, entre outros, quando a HSP60 foi administrada por diversas vias (oral, nasal, intraperitoneal e subcutânea), dependendo do modelo (COELHO; FARIA, 2012).

### 1.9 Justificativa

As proteínas HSPs, por terem significativas ações no sistema imunológico e terem um caráter tolerogênico relevante (citado anteriormente), tornaram-se boas candidatas para serem usadas em experimentos de tolerância oral. Isso foi realizado com sucesso em experimentos de artrite induzidas com adjuvantes em ratos (COBELENS *et al*, 2002) e aterosclerose em camundongos (MARÓN *et al*, 2002). Nesses casos, foi utilizado a HSP65, que corresponde à proteína microbiana homóloga à HSP60 de mamíferos.

Mais recentemente, o grupo do Laboratório de Imunobiologia da UFMG, utilizou-se da proteína HSP65 para a indução de tolerância oral, em um modelo de EAE em animais C57BL/6, imunizados posteriormente com MOG (REZENDE *et al*, 2012). Nesse estudo, a HSP65 foi ministrada através de uma bactéria gram-positiva da cepa *Lactococcus lactis*, contendo um plasmídeo codificador da HSP65 (com uma composição idêntica a de *Mycobacterium leprae*). Dessa forma, a proteína é

expressa e secretada para o meio extracelular, em um sistema induzido através de xilose, e através da via oral, chega diretamente ao intestino. Essa metodologia traz, portanto, os benefícios da tolerância oral induzida por pequenas doses, e ainda evita a necessidade de isolar, purificar e armazenar essa proteína. A outra vantagem é a produção em escala contínua de HSP65 livre de endotoxina.

Esse trabalho anterior do nosso grupo elucidou alguns mecanismos pelos quais o HSP65 produzido pelo *Lactococcus lactis* induz a tolerância oral e previne as manifestações da EAE. Foram focados principalmente os órgãos linfóides, com medidas de citocinas e estudo fenótipo de células T durante o desenvolvimento da EAE, entre outros. Este trabalho de mestrado é uma continuação do estudo anterior que tem como objetivo entender melhor a ação inibitória da administração oral de HSP65 nos eventos inflamatórios que ocorrem no sistema nervoso central (medula espinhal), o órgão mais acometido nesse caso. Acreditamos que esse entendimento é fundamental para que posteriormente novos conhecimentos sejam adicionados às práticas clínicas vigentes e à própria pesquisa básica na área da imunologia.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Estudar os mecanismos imunológicos desencadeados na medula espinhal envolvidos na modulação da EAE pela administração oral do *Lactococcus lactis* produtor de HSP65.

### **2.1 Objetivos específicos**

- Confirmar, através do índice macroscópico, se o HSP65 preveniu as manifestações da EAE;
- Avaliar o infiltrado inflamatório na medula espinhal de animais tratados com HSP65;
- Visualizar a migração de leucócitos para a medula espinhal, quantificando a chegada de células e correlacionando ao índice macroscópico;
- Estudar o fenótipo das células T reguladoras presentes na medula espinhal;
- Estudar variáveis envolvidas na migração de leucócitos para o sistema nervoso central, avaliando receptores de quimiocinas e algumas integrinas.

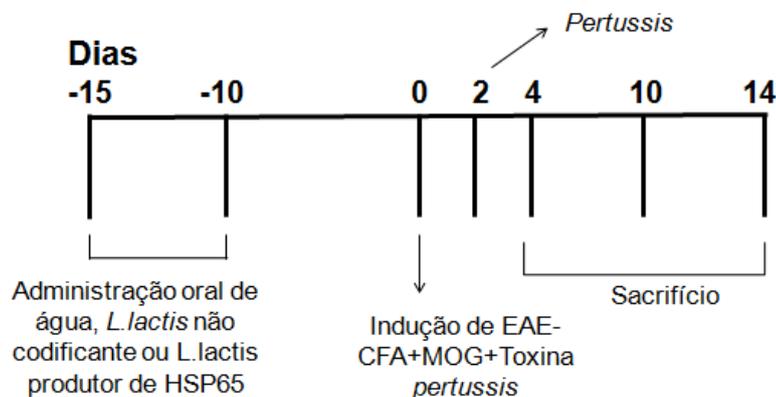
### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

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

#### 3.2 Desenho experimental

Animais C57BL/6 ou C57BL/6 Foxp3-GFP, machos e fêmeas, entre 6 e 8 semanas de vida, receberam por via oral *ad libitum* durante 5 dias água, *Lactococcus lactis* contendo plasmídeo extra não codificante (cepa utilizada apenas para a obtenção de parâmetros histológicos) e *Lactococcus lactis* com plasmídeo extra produtor de HSP65. O meio contendo a bactéria foi trocado diariamente. Dez dias após o final do tratamento oral, os animais foram imunizados para a indução da EAE. Por fim, em dias específicos após a imunização (4, 10 e 14) foram sacrificados para a realização de análises histológicas, microscopia intravital e obtenção de células para citometria de fluxo. O desenho experimental ocorreu conforme demonstrado na figura 1.



**Figura1: Desenho experimental**

### 3.3 Obtenção das linhagens bacterianas

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

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

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

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

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

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

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

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

### 3.6 Indução da encefalomielite autoimune experimental

Passados 10 dias do último dia do tratamento oral, a EAE foi induzida. Camundongos C57BL/6 e C57BL/6 Foxp3-GFP foram imunizados na base da cauda, subcutaneamente, com 100µg do peptídeo proveniente da MOG (*myelin oligodendrocyte glycoprotein*), chamado MOG<sub>35-55</sub> (Proteimax), sequência MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK. O peptídeo foi injetado em uma emulsão de adjuvante completo de Freund (CFA, *complete Freund adjuvant*) contendo 4mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (Difco). No dia da imunização e 48 horas após, foi injetada intraperitonealmente uma solução contendo 300ng de toxina *pertussis* (Sigma).

### 3.7 Índice macroscópico

O índice macroscópico (índice clínico) foi realizado do 1º até o 14º dia após a imunização, tanto nos animais C57BL/6 quanto nos C57BL/6 Foxp3-GFP. Consiste de análises de parâmetros clínicos, em que as manifestações da doença foram observadas, classificadas e quantificadas. Dessa forma, teve-se que: 0 pontos correspondeu a nenhuma manifestação da EAE; 0,5 (paralisação parcial da cauda); 1 (paralisação da cauda ou mudança no padrão da caminhada); 1,5 (paralisação parcial da cauda e mudança no padrão da caminhada); 2 (paralisia da cauda e mudança no padrão da caminhada); 2,5 (paralisia parcial de uma pata); 3 (paralisia de uma pata); 3,5 (paralisia de uma pata e paralisia parcial de outra); 4 (paralisia completa das patas traseiras); 4,5 (paralisia completa das patas traseiras e parcial das dianteiras); 5 (animal praticamente sem movimento).

### 3.8 Histologia

As medulas espinhais dos animais tratados com água, *L.lactis* com plasmídeo não codificante ou *L.lactis* produtor de HSP65 foram extraídas nos dias 4 e 14 após a imunização. A fixação foi através de uma solução contendo 20% de dimetilsulfóxido e 80% de metanol, por 6 dias a  $-80^{\circ}\text{C}$ , e 24 horas à  $-20^{\circ}\text{C}$ . A medula espinhal foi então acondicionada em Paraplast<sup>®</sup>, sendo que pedaços de 5 $\mu\text{m}$  foram cortados e corados com hematoxilina e eosina. As secções foram avaliadas quanto às modificações histopatológicas, como infiltrado inflamatório e lesões na substância branca. Foi utilizado um microscópio ótico (Olympus BX41) e uma câmera (Moticam 2500) para a obtenção das imagens. Para a quantificação das células, fez-se uso do programa ImageJ, em que campos de visão de cortes histológicos representativos foram analisados.

### 3.9 Extração de células para citometria de fluxo

Os órgãos linfóides secundários analisados nesse trabalho (baço e linfonodos mesentérico, inguinal e cervical) foram extraídos em dias específicos após a indução da EAE. As suspensões das células foram homogeneizadas e centrifugadas a 1200rpm por 10 minutos sob refrigeração a  $4^{\circ}\text{C}$ . A lise de hemácias do baço foi feita com PBS 10X diluído 1:10 em água. Posteriormente, as células foram novamente centrifugadas e ressuspendidas em RPMI 1640 (GIBCO BRL) acrescido de 10% de soro fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de sulfato de gentamicina, 25 mM de HEPES (Sigma, St. Louis, Missouri) e 50 $\mu\text{M}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol (Amersham Pharmacia Biotech), pH 7,2. As células foram contadas no microscópio ótico, com câmara de Neubauer.

### 3.10 Obtenção de células mononucleares da medula espinhal

Para a obtenção das células da medula espinhal, esta foi extraída de maneira cuidadosa e cortada em pequenos pedaços, que foram colocados em tubos cônicos contendo 3 ml meio RPMI 1640, completados com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de sulfato de gentamicina, 25 mM de HEPES e 50 $\mu\text{M}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol, além de 1,5mg/ml da colagenase tipo IV (Sigma). Esses tubos foram submetidos à agitação lenta a  $37^{\circ}\text{C}$ , por 20 minutos, sendo posteriormente adicionados mais 2 ml de meio completo, com 1,5mg/ml de colagenase. Após

ficarem mais 20 minutos sob agitação, as amostras foram homogeneizadas, transferidas para tubos cônicos de 50 ml e 45 ml de meio completo foi adicionado. A lavagem foi feita com centrifugação a 1200rpm, por 5 minutos, a 4°C, com descarte do sobrenadante. O precipitado foi ressuspenso com 3ml de Percoll 35%, e posteriormente foi adicionado 3ml de Percoll 65%, cuidadosamente. As amostras foram então centrifugadas por 30 minutos, a 2000rpm, 4°C. O anel formado entre as duas camadas de Percoll corresponde às células mononucleares. Este foi retirado, transferido para outro tubo cônico e lavado com adição de 10ml de meio completo e centrifugação por 10 minutos, a 1200rpm, 4°C. O precipitado foi ressuspenso em 0,2ml de meio completo, e assim as células foram contadas no microscópio ótico, com câmara de Neubauer.

### **3.11 Citometria de fluxo**

Células isoladas dos órgãos foram plaqueadas em uma quantidade aproximada de  $1 \times 10^6$ . Em seguida, foram adicionados 25µl por poço do coquetel de anticorpos monoclonais anti-marcadores fenotípicos conjugados com FITC (fluoresceína), PE (ficoeritrina), Cy5 (Cy-chrome), PerCP Cy5.5, Alexa Fluor 647 ou biotina. As células foram incubadas por 30 minutos a 4°C, no escuro. Posteriormente, elas foram lavadas com 100µl por poço de PBS-BSA- $\text{NaN}_3$  e centrifugadas a 1200 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e, então, o procedimento de lavagem foi novamente repetido. Posteriormente, as células marcadas com anticorpo biotina foram submetidas a uma nova incubação (30 minutos) com estreptavidina APC (aloficocianina) e lavadas mais 2 vezes, conforme descrito. Finalmente, as células marcadas foram ressuspendidas em 200µl de solução fixadora (0,5% de formaldeído em PBS1X) e mantidas a 4°C, no escuro até o dia seguinte.

No caso da marcação do Foxp3, é necessária a permeabilização das células. Após a primeira etapa, foi utilizado o *kit* de permeabilização comercial (e-Bioscience) e em seguida as amostras foram incubadas por mais trinta minutos com anticorpo anti-foxp3- PE de camundongo. Após as lavagens com PBS-BSA- $\text{NaN}_3$ , as amostras foram fixadas com paraformaldeído 0,5% e armazenadas a 4°C para leitura no citômetro.

Os anticorpos utilizados foram: anti-CD4 (FITC); anti-Foxp3 (PE); anti-LAP (PE); anti-CD4 (Cy5); anti-CD183 (CXCR3) (PerCP Cy5.5); anti-CD196 (CCR6) (Alexa 647); anti-CD49d (biotinilado); anti-CD11a (biotinilado); Estreptavidina (APC). A leitura foi feita usando o FACScan ou FACScalibur (Beckton Dickinson, Mountain View, Califórnia), e as análises através do programa FlowJo (Tree Star Inc).

### **3.12 Microscopia intravital**

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de 0,1ml de solução contendo 1,7mg do anestésico cloridrato de quetamina misturado a 0,33mg do relaxante muscular 2-(2,6-xilino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina (xilazina) diluídos em tampão fisiológico. Após a confirmação de que não respondiam mais aos estímulos causadores de dor, os camundongos foram colocados em uma placa de vidro que recebia iluminação para aquecer o ambiente, mantendo-o a 37°C. Com cuidado, foram feitos cortes na coluna vertebral, para permitir a exposição da medula espinhal sem lesionar o órgão. A região do animal exposta era constantemente molhada com um fluido artificial. Para a observação dos leucócitos nas vênulas pós-capilares da medula espinhal, eles foram corados com rodamina 6G (Sigma), injetada intravenosamente na cauda (em uma concentração de 0,05%, 0,15ml/camundongo). Para a observação do rolamento celular, utilizou-se um microscópio (Nikon Instruments Inc., Japan) equipado com uma fonte de luz fluorescente (150w), em conjunção com um filtro (Zeiss, Wetzlar, Germany). A objetiva utilizada foi de 20x. A câmera intensificadora de luz (5100 HS; Panasonic, Secaucus, NJ) acoplada ao microscópio projetou a imagem em um monitor de computador. Os vasos escolhidos para a observação tinham diâmetro entre 40 e 60 µm. Os leucócitos em rolamento foram considerados aqueles movendo-se com velocidade inferior às outras células dentro de um determinado vaso, enquanto os aderentes aqueles que ficaram estacionários por mais de 30 segundos.

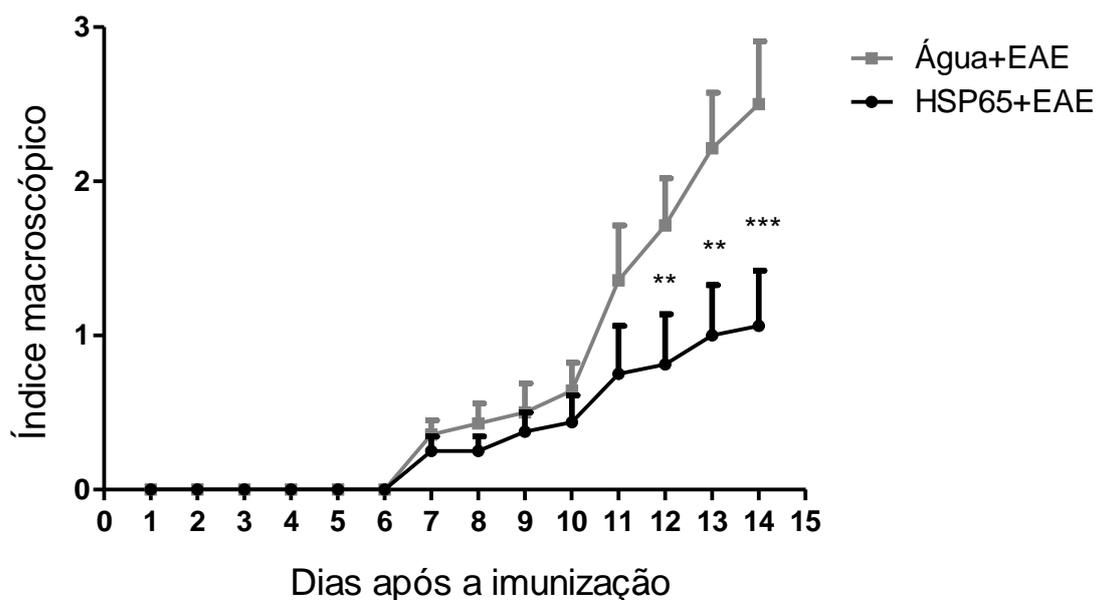
### **3.13 Análises estatísticas**

O Teste t de Student foi utilizado para comparações entre dois grupos experimentais. Em um único caso, utilizou-se a análise de variância (ANOVA), com o teste de Tukey, para calcular a significância entre os grupos.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Efeitos da administração do *L.lactis* produtor de HSP65 no desenvolvimento da EAE

Inicialmente, testamos o efeito da administração oral prévia do *Lactococcus lactis* produtor de HSP65 no desenvolvimento das manifestações clínicas da EAE. Os parâmetros descritos na metodologia (item 3.7) foram utilizados para avaliar as manifestações de EAE em camundongos C57BL/6 e C57BL/6 Foxp3-GFP. Como já foi demonstrado pelo nosso grupo que a administração oral de *L.lactis* com plasmídeo vazio não codificador de HSP65 é incapaz de prevenir a EAE (REZENDE *et al*, 2012), utilizamos como controle apenas o grupo que recebeu água anteriormente à imunização.



**Figura 2: Efeito do *L.lactis* produtor de HSP65 no desenvolvimento da EAE**

Camundongos C57BL/6 e C57BL/6 Foxp3/GFP foram tratados com água (grupo “Água+EAE”) ou com *L.lactis* produtor de HSP65 (grupo “HSP65+EAE”) por 5 dias, e 10 dias depois foram imunizados para a indução de EAE. Foram utilizados 14 animais no grupo Água+EAE, e 15 no grupo HSP65+EAE. O curso da EAE é demonstrado pela média do índice clínico de cada animal  $\pm$  padrão. A significância da diferença entre os grupos foi calculada pelo teste t de Student. \* Representa  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

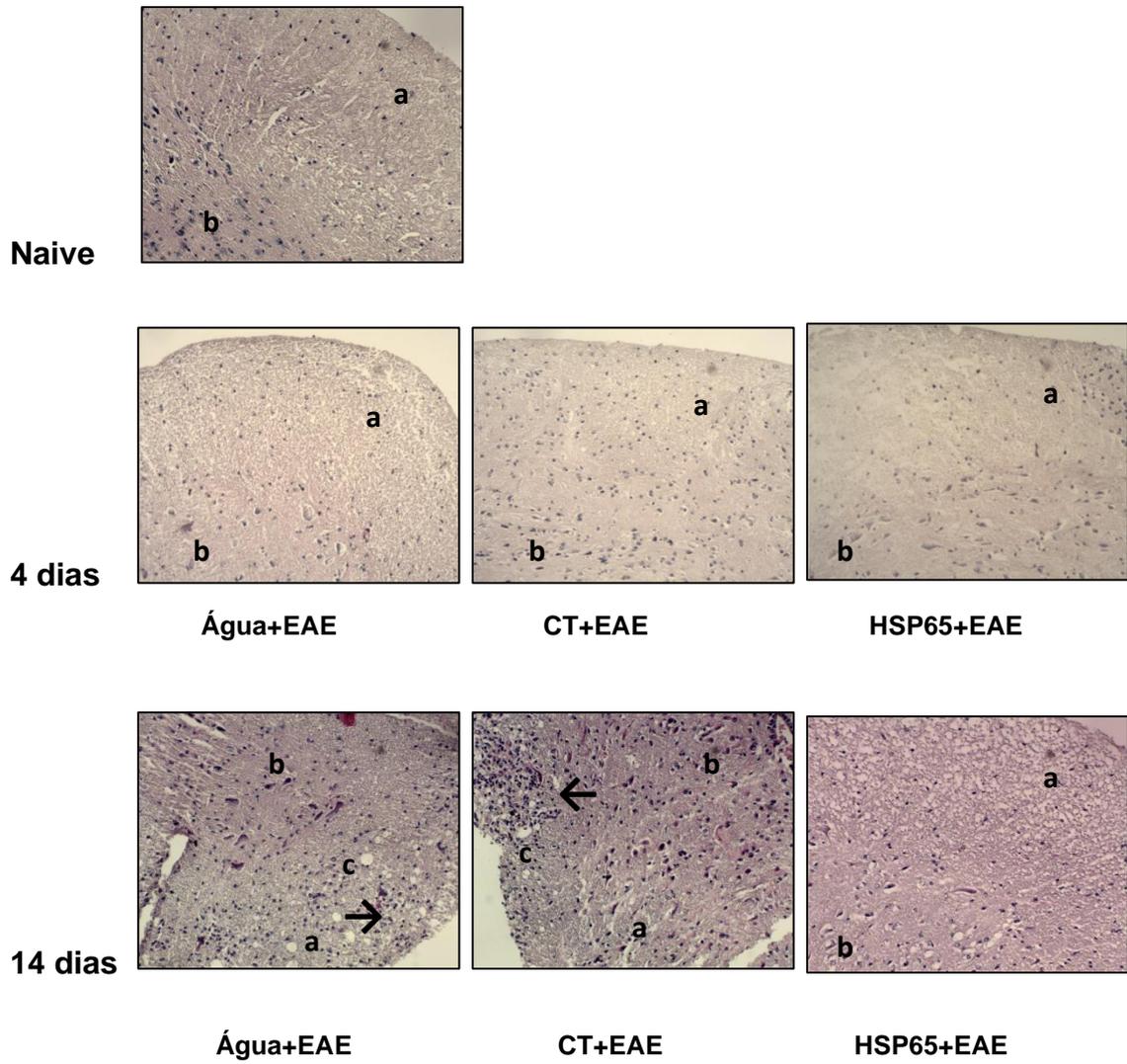
O índice macroscópico foi realizado até o 14º dia após a imunização, momento em que ocorre o pico das manifestações de EAE. Demonstramos, então,

que a ingestão contínua de *L.lactis* produtor de HSP65 preveniu a EAE e que tais diferenças foram observadas principalmente nos dias mais próximos ao pico da doença (figura 2).

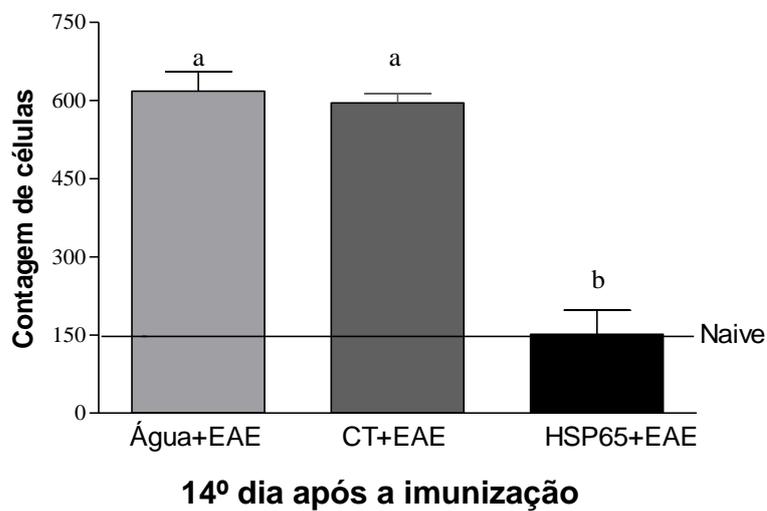
#### **4.2 Efeito do *L.lactis* produtor de HSP65 no infiltrado celular da medula espinhal de camundongos com EAE**

Utilizamos a análise histológica para demonstrar se o tratamento com o *L.lactis* produtor de HSP65 modifica os aspectos relativos à EAE na medula espinhal. Nesse caso, utilizamos também um grupo de animais que receberam a bactéria contendo o plasmídeo não codificante, para avaliar se ela teria alguma influência na composição celular do órgão (embora o uso dessa bactéria como tratamento não produza nenhum efeito no índice clínico da doença).

A



B



### **Figura 3: Efeito da administração do *L.lactis* produtor de HSP65 no infiltrado celular da medula espinhal de camundongos com EAE**

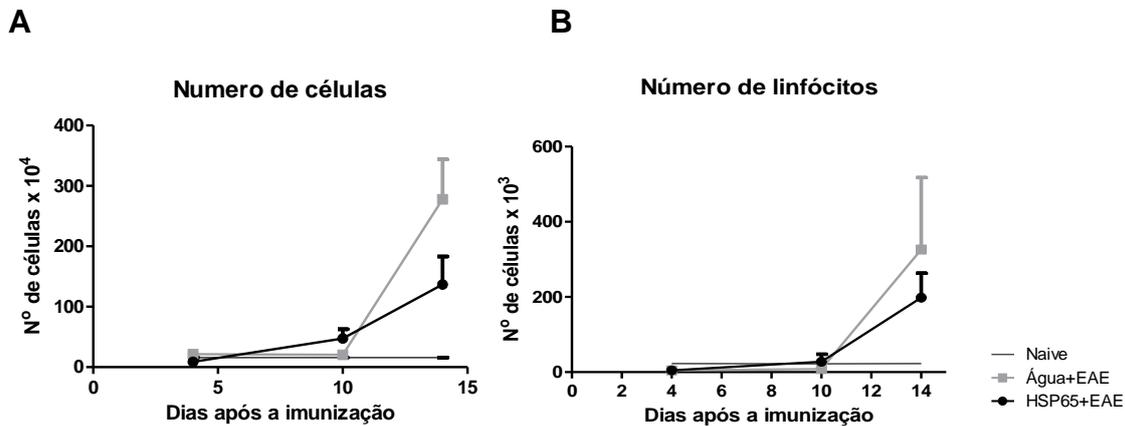
A-Secções transversais representativas da medula espinhal de animais C57BL/6, coradas com hematoxila-eosina (HE). Camundongos C57BL/6 foram tratados com água (grupo “Água+EAE”), com *L.lactis* portando o plasmídeo não codificante (“CT+EAE”) ou com *L.lactis* produtor de HSP65 (grupo “HSP65+EAE”) por 5 dias, e 10 dias depois foram imunizados para a indução de EAE. **(A)** a: substância branca; b: substância cinzenta; c: áreas lesadas; setas: infiltrado inflamatório. Aumento:100x. **(B)** Número de células contadas em um campo de visão específico das lâminas de medula espinhal, no 14º dia após a imunização. As barras correspondem às médias de 3 animais  $\pm$  erro padrão. A significância das diferenças entre os grupos foram calculadas por ANOVA, com pós-teste de Tukey. A média do grupo *Naive* é representada como uma linha para referência, não interferindo na análise estatística.

Observamos que 4 dias após a imunização não havia nenhum sinal de inflamação em nenhum dos grupos testados. Já no 14º dia, apenas o grupo HSP65+EAE não apresentou infiltrado inflamatório ou áreas lesadas na medula espinhal (figura 3.A). Uma contagem em um campo de visão definido (figura 3.B), no 14º dia, corrobora as observações feitas nas lâminas histológicas, pois há uma redução no número de células apenas no grupo EAE+HSP65.

### **4.3 Efeito da administração de *L.lactis* produtor de HSP65 no número total de células e de linfócitos em diferentes pontos após a imunização**

Como foi visto que o infiltrado inflamatório na medula espinhal é uma condição fundamental para as manifestações da EAE, realizamos um estudo cinético do número total de células mononucleares (figura 4.A) e de linfócitos (figura 4.B) em diferentes pontos após a imunização (4, 10 e 14 dias). Nesse estudo, as células presentes na medula espinhal foram isoladas da medula espinhal e contadas em câmara de Neubauer e por citometria de fluxo. O 4º dia foi utilizado para representar um possível início da saída das células dos órgãos linfóides secundários em direção à medula espinhal (REZENDE *et al*, 2012), o 14º dia para representar um momento com maior infiltrado na medula espinhal (como visto nas histologias e microscopia intravital), e o 10º dia corresponde a um período intermediário. Procuramos correlacionar o número de células encontrado com o índice clínico da doença em cada grupo. Foram observadas diferenças maiores apenas no 14º dia após a imunização (embora não corroboradas pela estatística, o que será abordado

na discussão), o que é respaldado pelo fato de ser o ponto em que os índices clínicos diferem mais entre os grupos. Portanto, o fato do grupo HSP65+EAE possuir menor quantidade de células mononucleares e de linfócitos na medula espinhal é convergente com a prevenção da EAE que nos animais desse grupo.

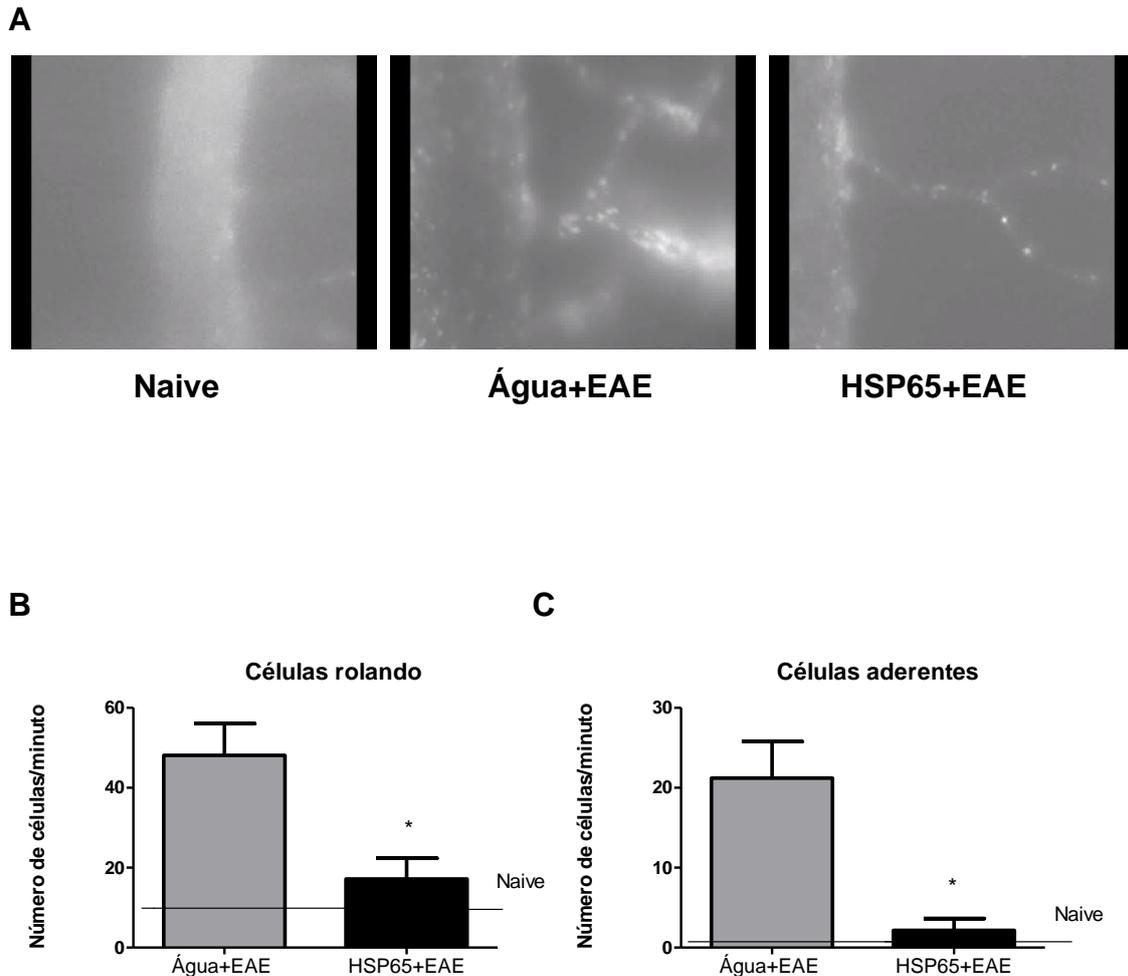


**Figura 4: Efeito da administração de *L.lactis* produtor de HSP65 no número de células na medula espinhal em diferentes dias após a imunização**

Camundongos C57BL/6 Foxp3/GFP foram tratados com água (grupo “Água+EAE”) ou com *L.lactis* produtor de HSP65 (grupo “HSP65+EAE”) por 5 dias, e 10 dias depois foram imunizados para a indução de EAE. Nos dias 4, 10 e 14 após a imunização, a medula espinhal foi retirada e processada para a extração de células. As linhas correspondem às médias de *pools* (junção) de 5 animais por grupo, em 3 experimentos independentes  $\pm$  erro padrão. A análise estatística foi feita pelo teste t de Student. A média do grupo *Naive* é representada como uma linha para referência, não interferindo na análise estatística. **(A)** Contagem das células feita através da câmara de Neubauer, após extração das células mononucleares e coloração com eritrocina. **(B)** Contagem de linfócitos feita por citometria de fluxo, após análise e separação (*gate*).

#### 4.4 Efeito da administração do *L.lactis* produtor de HSP65 na migração de leucócitos para a medula espinhal

A microscopia intravital foi a metodologia escolhida para ajudar a entender o motivo pelo qual o grupo que recebe o *L.lactis* produtor de HSP65 possui um menor infiltrado inflamatório. Visualizando e quantificando a entrada de células na medula espinhal dos camundongos, procuramos entender se um número menor de células encefalitogênicas chegam aos vasos que irrigam o órgão, ou se a diferença principal entre os grupos é a aderência e posterior entrada dessas células na medula.



**Figura 5: Quantificação da migração e aderência celular por microscopia intravital**

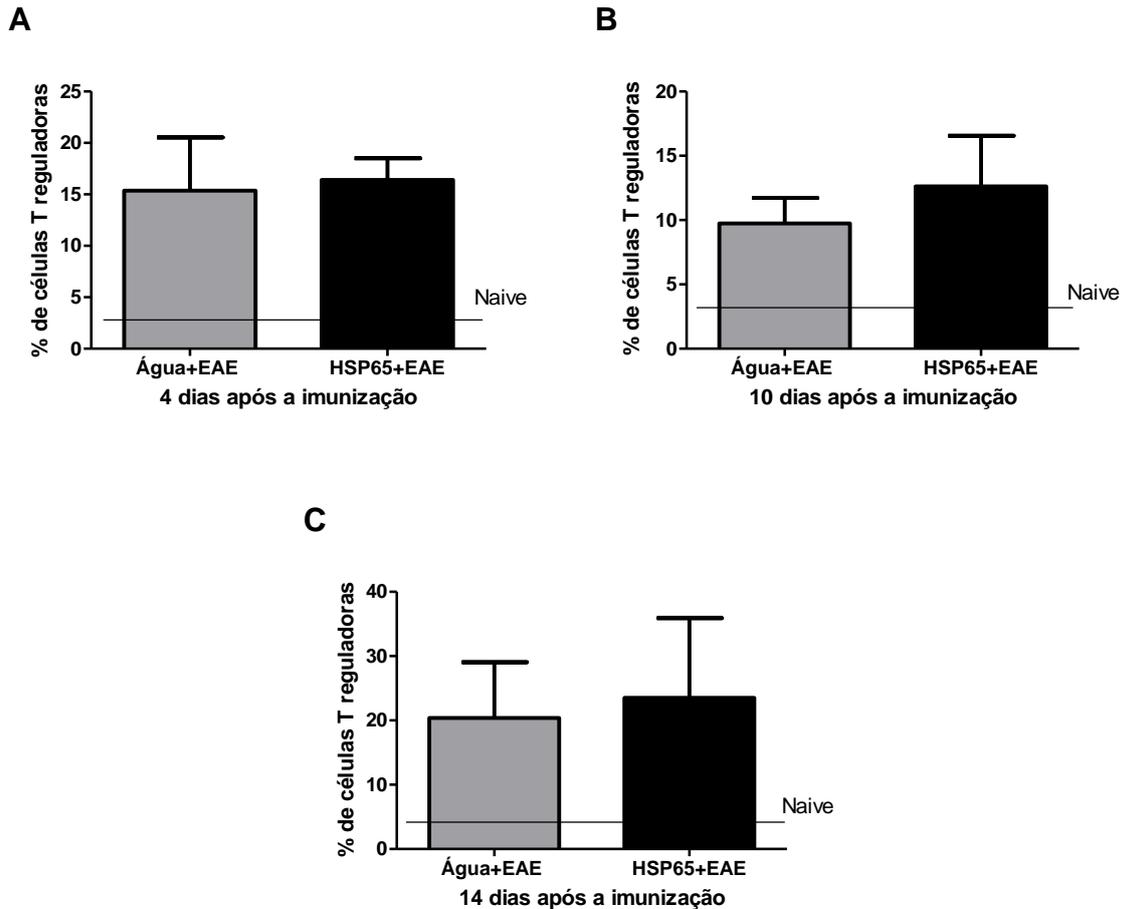
Camundongos C57BL/6 foram tratados com água (grupo “Água+EAE”) ou com *L.lactis* produtor de HSP65 (grupo “HSP65+EAE”) por 5 dias, e 10 dias depois foram imunizados para a indução de EAE. No 14º dia após a imunização, 5 animais por grupo foram submetidos a análises por microscopia intravital. Animais devidamente anestesiados foram mantidos vivos em uma placa de vidro, em um ambiente aquecido a 37°C. Leucócitos foram marcados por administração venosa de rodamina. Vênulas pós-capilares com diâmetro entre 40 e 60µm foram analisadas. Na figura **A** podem ser visualizadas imagens representativas. Células foram consideradas rolando (**B**) ou aderentes (**C**) conforme descrito na metodologia. As barras correspondem às médias de 3 animais  $\pm$  erro padrão. A significância das diferenças entre os grupos foram calculadas pelo test t de Student. A média do grupo *Naive* é representada como uma linha para referência, não interferindo na análise estatística. \* Representa  $p < 0,05$ . Obs: grupo HSP65+EAE não diferiu do grupo *Naive* tanto no quesito rolamento ( $p = 0,3520$ ) quanto na aderência ( $p = 0,3791$ ).

Observamos que os animais do grupo HSP65+EAE possuem um número menor de células rolando pelos vasos sanguíneos, e também um número menor de células aderindo neles (figura 5). Isso pode indicar que tanto processos envolvendo

a saída das células dos órgãos linfóides e posterior chegada nas regiões perivasculares do sistema nervoso central, quanto fatores envolvidos na penetração delas nas meninges, são alterados pela ingestão do *L.lactis* produtor do HSP65. É interessante mencionar que o efeito da tolerância oral nesse caso faz com que os parâmetros do grupo tratado não sejam diferentes estatisticamente dos animais não manipulados (ver legenda da figura 4).

#### **4.5 Efeito da administração de *L.lactis* produtor de HSP65 na frequência das células T reguladoras na medula espinhal**

Partindo do princípio que a obtenção do número absoluto de células na medula espinhal ainda é um parâmetro que não explica o porquê da prevenção da EAE no grupo que recebe o *L.lactis* produtor de HSP65, procuramos obter a frequência das células T reguladoras CD4<sup>+</sup> em diferentes momentos após a indução da doença: 4 dias (figura 6.A), 10 dias (figura 6.B) e 14 dias (figura 6.C). Como já abordado anteriormente, tais células são fundamentais na manutenção da homeostasia do organismo, bem como na indução do fenômeno da tolerância oral.



**Figura 6: Efeito da administração do *L.lactis* produtor de HSP65 na freqüência de células T reguladoras na medula espinhal**

Camundongos C57BL/6 Foxp3/GFP foram tratados com água (grupo “Água+EAE”) ou com *L.lactis* produtor de HSP65 (grupo “HSP65+EAE”) por 5 dias, e 10 dias depois foram imunizados para a indução de EAE. Nos dias 4, 10 e 14 após a imunização, a medula espinhal foi retirada e processada para a extração de células. A freqüência das células T reguladoras foi calculada por análise de dados obtidos por citometria de fluxo, com separação de linfócitos dentro do total de eventos lidos, e de CD4 dentro do *gate* de linfócitos. Foram consideradas três classes de células T reguladoras: CD4+FOXP3<sup>-</sup>LAP<sup>-</sup>; CD4+FOXP3<sup>+</sup>LAP<sup>-</sup>; CD4+FOXP3<sup>-</sup>LAP<sup>+</sup>, sendo a freqüência delas somada. As barras correspondem às médias de *pools* (conjuntos) de 5 animais por grupo, em 3 experimentos independentes  $\pm$  erro padrão. A análise estatística foi através feita pelo teste t de Student. A média do grupo *Naive* é representado como uma linha para referência, não interferindo na análise estatística. **(A)** Freqüência de linfócitos CD4<sup>+</sup> reguladores 4 dias após a imunização. **(B)** Freqüência de linfócitos CD4<sup>+</sup> reguladores 10 dias após a imunização. **(C)** Freqüência de linfócitos CD4<sup>+</sup> reguladores 14 dias após a imunização.

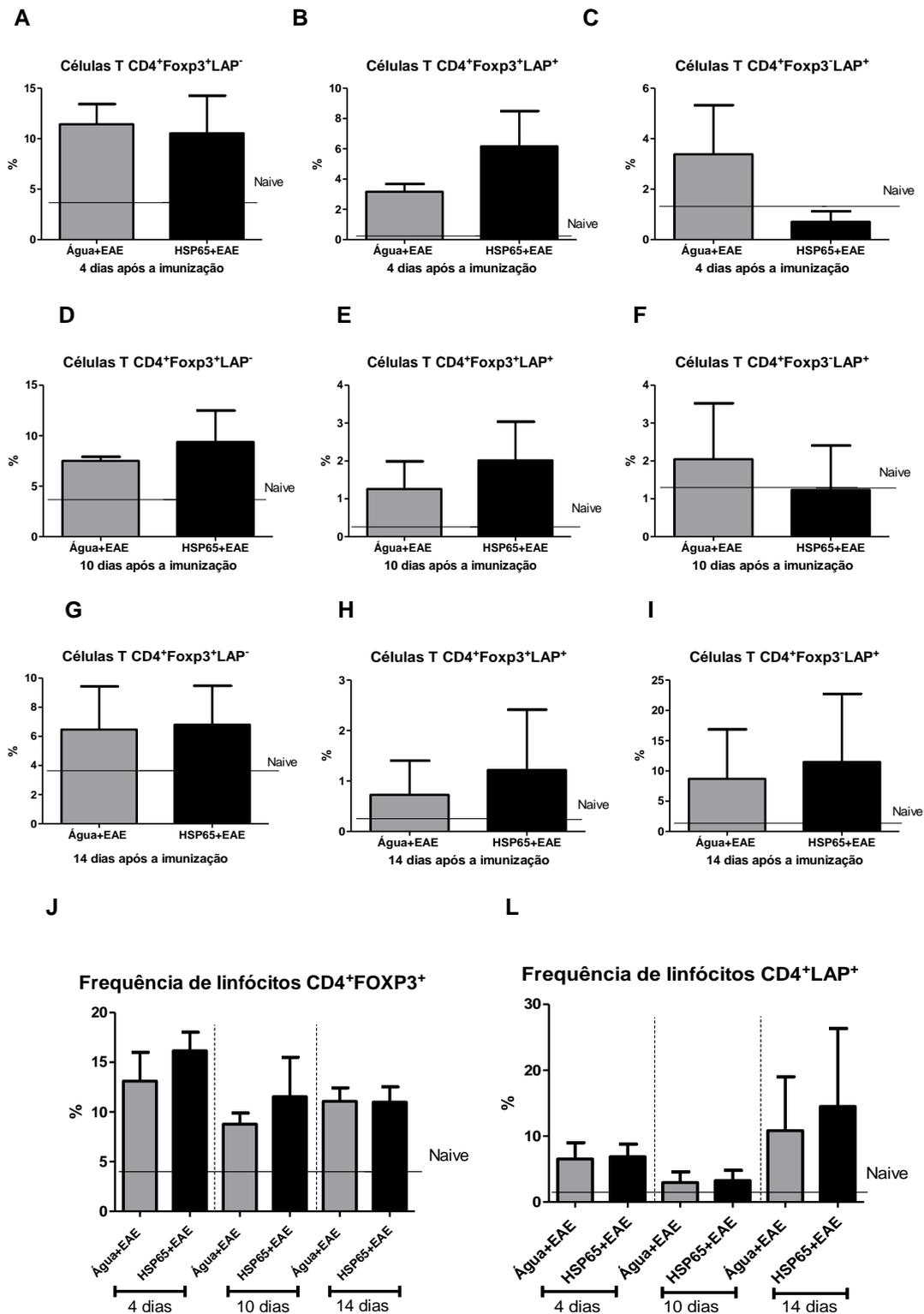
Em todos os momentos analisados, o grupo HSP65+EAE apresentou um leve aumento da frequência dessas células. No entanto, acreditamos que a significância estatística desse aumento não pôde ser obtida devido ao erro padrão alto. Observamos uma variação grande nos valores obtidos de cada animal que pode ser devida às dificuldades da técnica (abordado na discussão). Outra possibilidade que explicaria essa alta variação seria o fato de existirem, na subpopulação das células T CD4<sup>+</sup> reguladoras, alguns subtipos, sendo alguns provavelmente mais relevantes que outros no controle da inflamação em diferentes momentos após a indução da EAE (próximo item).

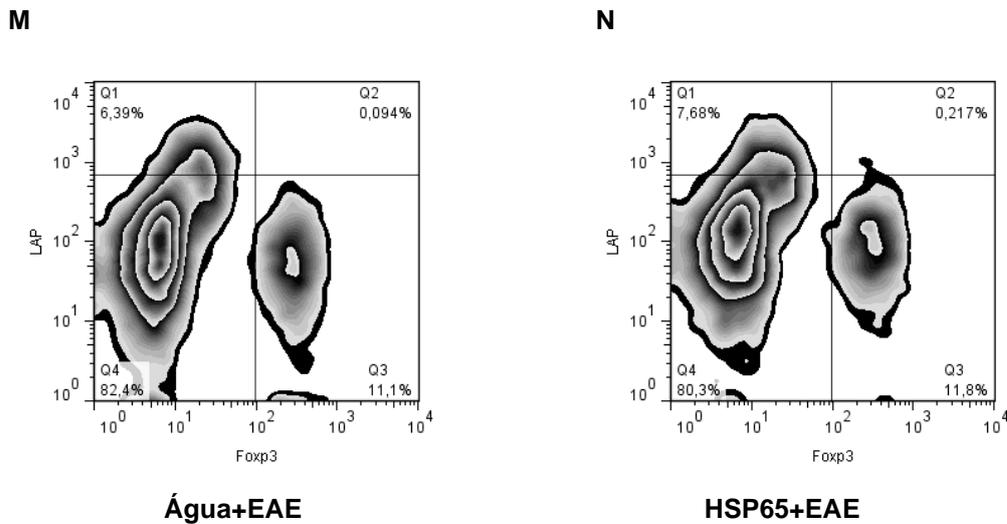
#### **4.6 Estudo dos subtipos de células T reguladoras na medula espinhal**

Recentemente, nosso grupo de pesquisa (Rezende e colaboradores) estudou a influência do *L.lactis* produtor de HSP65 no modelo de EAE. A prevenção obtida através desse tratamento oral foi atribuída em grande parte à modulação que ele provocou na frequência de células T reguladoras CD4<sup>+</sup> em órgãos linfóides no 2<sup>o</sup> e 4<sup>o</sup> dias após a imunização. Demonstramos que células T CD4<sup>+</sup> que expressam o TGF- $\beta$  na membrana (chamada aqui de LAP<sup>+</sup>), e dentre estas, as que não expressam Foxp3, marcador típico de uma célula T reguladora clássica, estão particularmente envolvidas no efeito do *L.lactis* produtor de HSP65. O aumento da frequência desse tipo celular (perfil Th3) pode estar associado com a mudança no padrão de citocinas nesses mesmos órgãos linfóides, inibição da migração de células encefalitogênicas para o sistema nervoso central e, conseqüentemente, com a redução do índice clínico.

Nesse contexto, para averiguar se o perfil de células T reguladoras CD4<sup>+</sup> na medula espinhal seria semelhante ao dos órgãos linfóides, estudamos o fenótipo de 3 tipos delas, classificadas de acordo com a expressão de Foxp3 e de LAP (CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>LAP<sup>-</sup>; CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup>; CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>LAP<sup>+</sup>), nos dias 4, 10 e 14 após a imunização (figuras 7.A-7.I). Apenas no 14<sup>o</sup> dia após a imunização, a frequência das células CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>LAP<sup>+</sup> no grupo tratado foi maior que a do não tratado. Curiosamente, no 4<sup>o</sup> e 10<sup>o</sup> dia esse tipo celular estava reduzido no grupo tratado, em detrimento de células CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> (4<sup>o</sup> dia) e das células CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>LAP<sup>-</sup> e CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> (10<sup>o</sup> dia), que têm a sua frequência aumentada. É interessante ressaltar que, ao analisar apenas a frequência das células expressando LAP,

independentemente da expressão de Foxp3 (figura 7.J) e vice versa (figura 7.L), não houve redução em nenhum ponto. Tais resultados, bem como o fato deles não serem estatisticamente significativos, serão analisados na discussão.





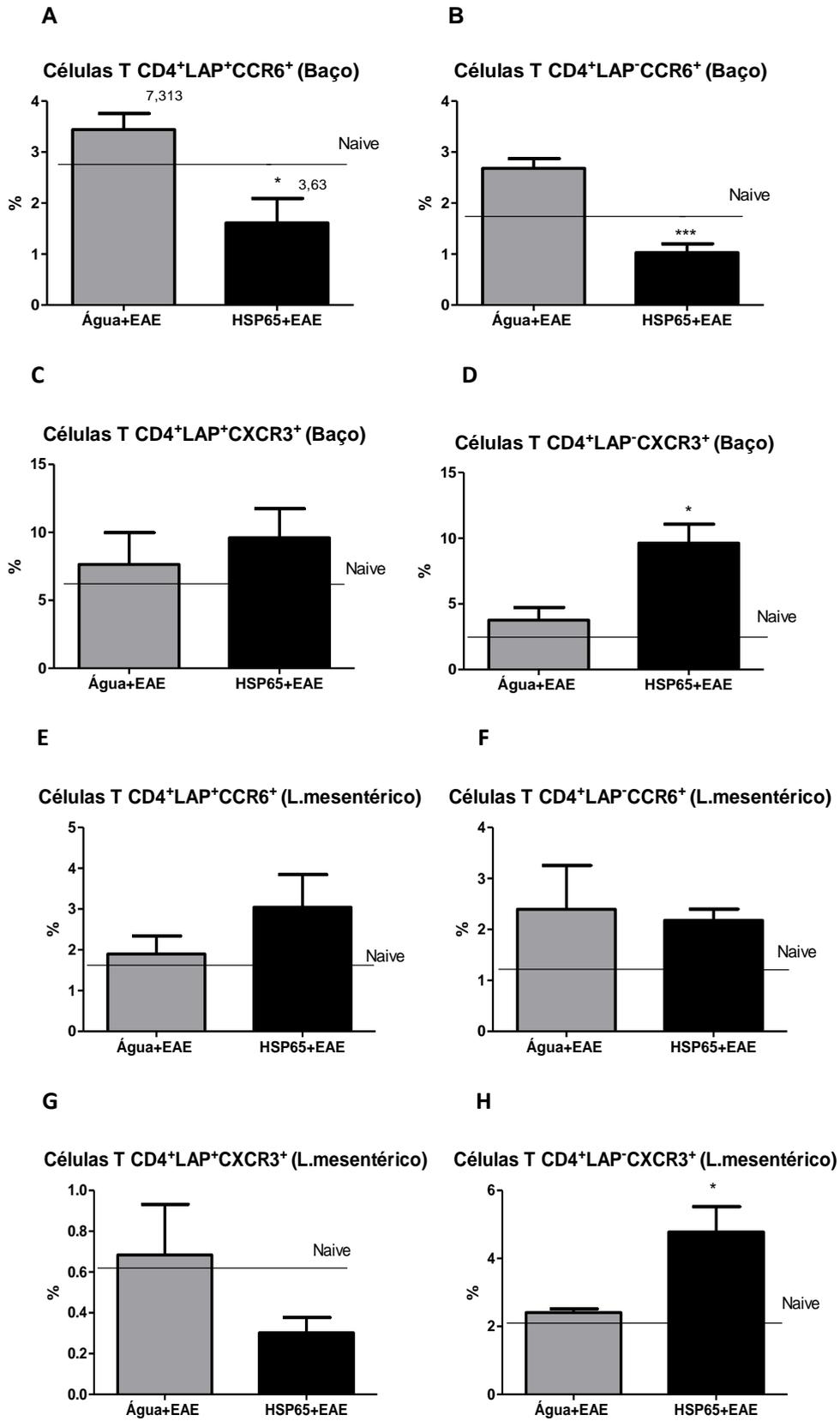
**Figura 7: Estudo do fenótipo das células T reguladoras na medula espinhal**

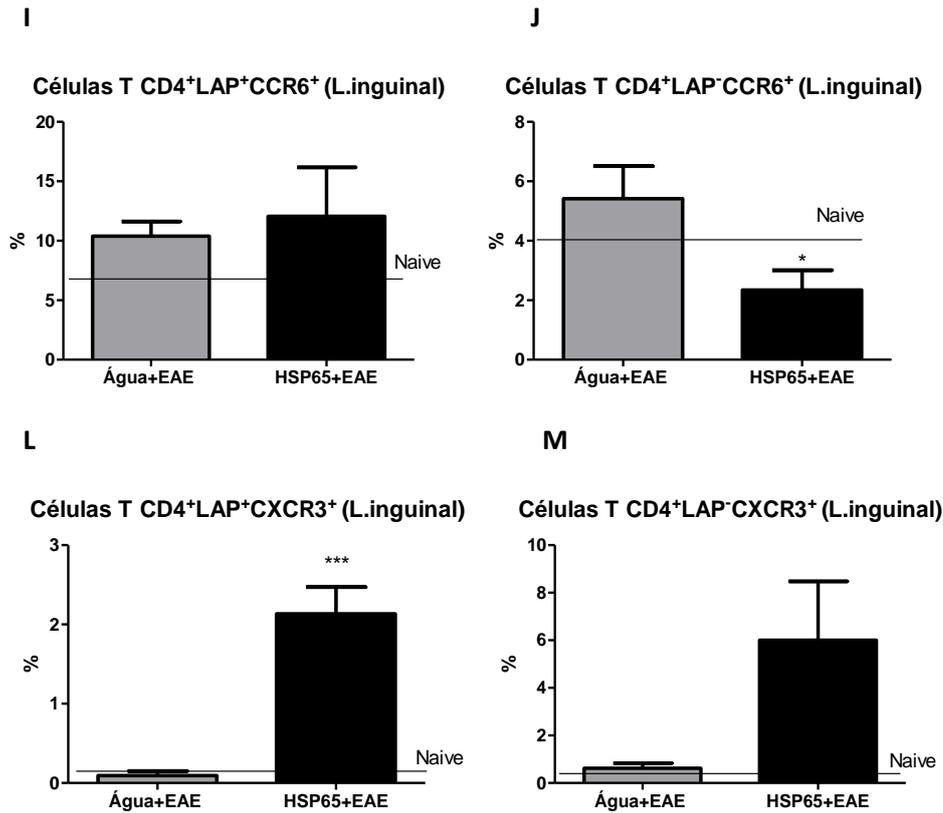
Camundongos C57BL/6 Foxp3/GFP foram tratados com água (grupo “Água+EAE”) ou com *L.lactis* produtor de HSP65 (grupo “HSP65+EAE”) por 5 dias, e 10 dias depois foram imunizados para a indução de EAE. Nos dias 4, 10 e 14 após a imunização, a medula espinhal foi retirada e processada para a extração de células. O estudo do fenótipo das células T reguladoras foi realizado por análise de dados obtidos por citometria de fluxo, com separação de linfócitos dentro do total de eventos analisados, e de CD4 dentro do *gate* de linfócitos. Foram consideradas três classes de células T reguladoras: CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>LAP<sup>-</sup>; CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup>; CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>-</sup>LAP<sup>+</sup>, sendo obtida a frequência de cada uma delas. As barras correspondem às médias de *pools* (conjuntos) de 5 animais por grupo, em 3 experimentos independentes  $\pm$  erro padrão. A análise estatística foi através do teste t de Student, como indicado abaixo. A média do grupo *Naive* é representado como uma linha para referência, não interferindo na análise estatística. **(A-C)** Comparação das frequências de células T reguladoras 4 dias após a imunização -teste t de Student. **(D-F)** Comparação das frequências de células T reguladoras 10 dias após a imunização - teste t de Student. **(G-I)** Comparação das frequências de células T reguladoras 14 dias após a imunização - teste t de Student. **(J-L)** Comparação das frequências de células T reguladoras em todos os tempos analisados (4, 10 e 14 dias após a imunização) – teste t de Student realizado entre os dois grupos, dentro de cada tempo. **(M-N)** *Plottings* de citometria de fluxo representativos da fenotipagem das células T reguladoras CD4<sup>+</sup> no 14º dia após a imunização.

#### **4.7 Expressão de receptores de quimiocinas nos órgãos linfóides secundários durante a EAE**

É conhecido que a indução desse modelo de EAE, bem como a eficiência da sua prevenção através da ingestão oral de *L.lactis* produtor de HSP65, somente são possíveis por fenômenos importantes que ocorrem nos órgãos linfóides secundários. Os linfonodos mesentéricos são de suma importância para a indução da tolerância oral, visto que são os primeiros em que os efeitos do HSP65, provavelmente em células apresentadoras de antígenos, ocorrem (PABST; MOWAT, 2012). Os linfonodos inguinais são os sítios linfóides de drenagem do local da imunização, onde ocorre uma resposta inflamatória aguda e ativação de células encefalitogênicas específicas para o antígeno imunizado. Portanto, esses dois linfonodos e o baço (onde circulam todas as células presentes no sangue representando, de forma global, o estado imunológico do organismo), foram utilizados para o estudo de dois receptores de quimiocinas importantes nesse modelo: CXCR3 e CCR6. Classicamente, são descritos como importantes para a migração de células encefalitogênicas, contribuindo para a migração de células Th1 (SORENSEN *et al*, 2002) e Th17 (REBOLDI *et al*, 2009), respectivamente, embora o CXCR3 possa exercer uma ação protetora na EAE, como abordado na discussão.

No 4º dia após a imunização, foram avaliadas a frequência e a expressão desses receptores em células CD4<sup>+</sup>, as principais indutoras da doença. Essas foram diferenciadas pela expressão de Foxp3 e LAP e, dentro de cada subtipo, a expressão dos receptores CXCR3 e CCR6 foi estudada (marcações descritas na legenda). Foram observadas diferenças significativas de frequência desses receptores apenas quando nos dois grupos (Água+EAE e HSP65+EAE) o parâmetro em questão era a expressão de LAP, tanto naqueles que expressavam ou não essa molécula (Figuras 8.A-8.M). É importante ressaltar que foram feitas duas marcações separadas, e a expressão de LAP não indica que a molécula Foxp3 não estivesse sendo também expressa, e vice versa.





**Figura 8: Frequência de células expressando receptores de quimiocinas nos órgãos linfóides secundários**

Camundongos C57BL/6 foram tratados com água (grupo “Água+EAE”) ou com *L.lactis* produtor de HSP65 (grupo “HSP65+EAE”) por 5 dias, e 10 dias depois foram imunizados para a indução de EAE. No 4º dia após a imunização, o baço e os linfonodos inguinal e mesentérico foram retirados e processados para a extração de células. A citometria de fluxo foi realizada com duas marcações separadas, uma com os anticorpos anti-CD4, -LAP, -CXCR3 e -CCR6 e outra com anti-CD4, -Foxp3, -CXCR3, -CCR6. Para a análise, foi realizada uma separação de linfócitos dentro do total de eventos analisados, e de CD4 dentro do *gate* de linfócitos. As barras correspondem às médias da frequência de células de 3 a 5 animais por grupo  $\pm$  o erro padrão. A análise estatística foi feita pelo teste t de Student. A média do grupo *Naive* é representado como uma linha para referência, não interferindo na análise estatística. \* Representa  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,1$ ; \*\*\*  $p < 0,01$ . **(A-D)** Frequência de células no baço; **(E-H)** Frequências de células no linfonodo mesentérico; **(I-M)** Frequência de células no linfonodo inguinal.

Em linhas gerais, os resultados demonstram uma redução de CCR6 nas células LAP<sup>-</sup> (maioria são efectoras), pois ele tem a frequência reduzida no baço e linfonodo inguinal. Interessantemente, tanto sua frequência como intensidade de expressão (esta é apresentada na tabela 1) é reduzida no baço, nas células que expressam LAP. Já o CXCR3 teve a frequência aumentada nas células LAP<sup>-</sup> no baço e linfonodo mesentérico, e dentro das células reguladoras LAP<sup>+</sup>, foi bem mais freqüente a sua expressão no linfonodo mesentérico.

**Tabela 1: Expressão dos receptores de quimiocinas pelas células dos órgãos linfóides secundários**

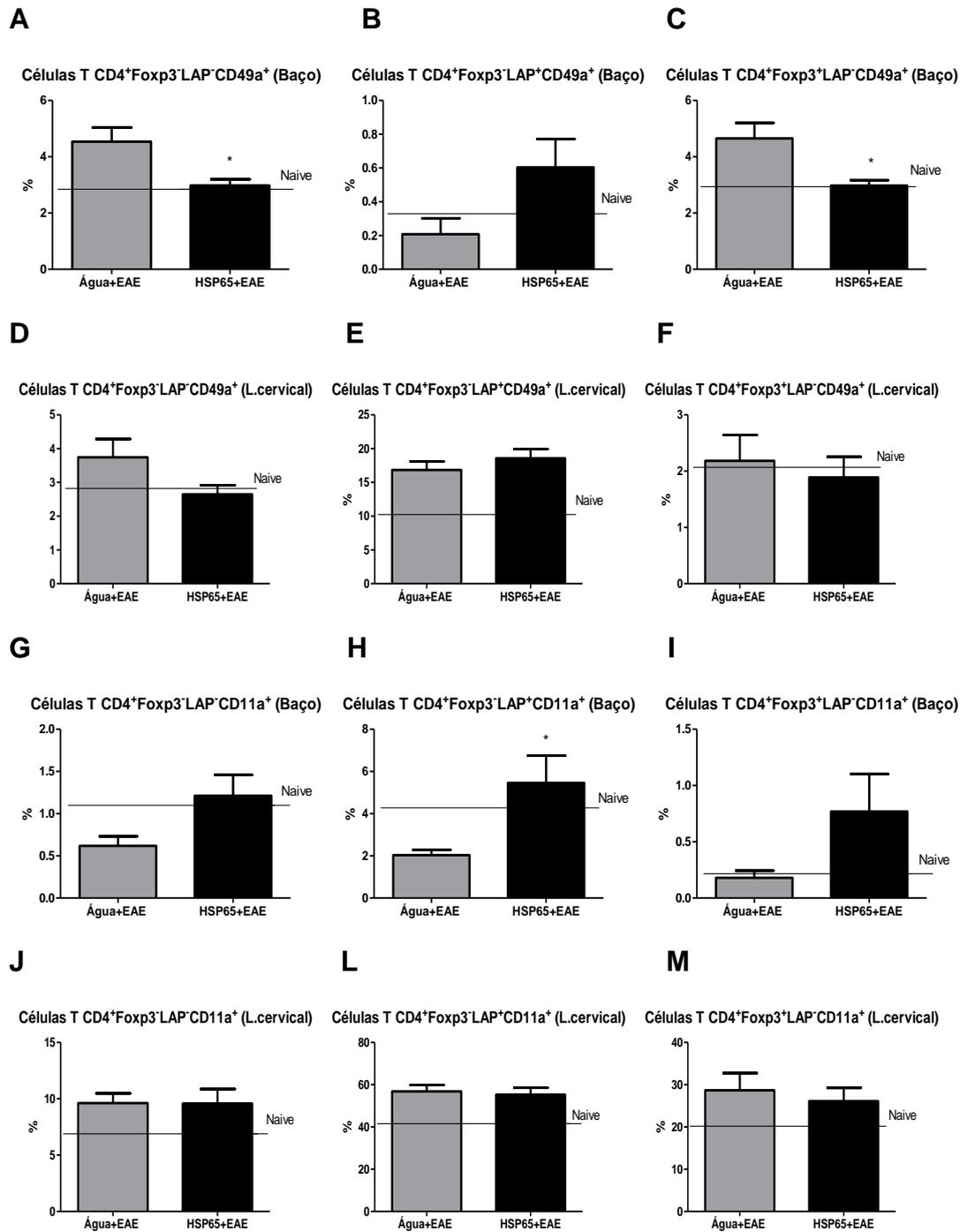
CCR6		CXCR3	
Água+EAE	HSP65+EAE	Água+EAE	HSP65+EAE
CD4 <sup>+</sup> LAP <sup>+</sup> (BAÇO) 7,313±0,95	CD4 <sup>+</sup> LAP <sup>+</sup> (BAÇO) 3,63±0,24 *	CD4 <sup>+</sup> LAP <sup>+</sup> (BAÇO) 22.07 ± 3.637	CD4 <sup>+</sup> LAP <sup>+</sup> (BAÇO) 28.42 ± 2.504
CD4 <sup>+</sup> LAP <sup>-</sup> (BAÇO) 5.160 ± 0.3086	CD4 <sup>+</sup> LAP <sup>-</sup> (BAÇO) 3.754 ± 0.3973	CD4 <sup>+</sup> LAP <sup>-</sup> (BAÇO) 5.320 ± 0.5279	CD4 <sup>+</sup> LAP <sup>-</sup> (BAÇO) 10.69 ± 1.972
CD4 <sup>+</sup> LAP <sup>+</sup> (LM) 8.200 ± 1.603	CD4 <sup>+</sup> LAP <sup>+</sup> (LM) 9.488 ± 0.8359	CD4 <sup>+</sup> LAP <sup>+</sup> (LM) 22.20 ± 1.069	CD4 <sup>+</sup> LAP <sup>+</sup> (LM) 22.38 ± 0.8714
CD4 <sup>+</sup> LAP <sup>-</sup> (LM) 5.607 ± 1.069	CD4 <sup>+</sup> LAP <sup>-</sup> (LM) 6.564 ± 0.7626	CD4 <sup>+</sup> LAP <sup>-</sup> (LM) 12.53 ± 1.933	CD4 <sup>+</sup> LAP <sup>-</sup> (LM) 13.90 ± 1.530
CD4 <sup>+</sup> LAP <sup>+</sup> (LI) 10.41 ± 0.6548	CD4 <sup>+</sup> LAP <sup>+</sup> (LI) 9.170 ± 3.016	CD4 <sup>+</sup> LAP <sup>+</sup> (LI) 9.940 ± 1.577	CD4 <sup>+</sup> LAP <sup>+</sup> (LI) 21.23 ± 4.022
CD4 <sup>+</sup> LAP <sup>-</sup> (LI) 6.173 ± 0.7853	CD4 <sup>+</sup> LAP <sup>-</sup> (LI) 6.340 ± 1.884	CD4 <sup>+</sup> LAP <sup>-</sup> (LI) 5.120 ± 0.7496	CD4 <sup>+</sup> LAP <sup>-</sup> (LI) 8.750 ± 2.941

Os valores correspondem aos MFIs (*Mean Fluorescence Intensity*) ± o erro padrão. A análise estatística entre os dois grupos foi feita pelo teste t de Student. Os MFIs foram comparados da mesma maneira que a frequência (em cada órgão, para cada fenótipo celular). \* Representa p<0,05. (LM) corresponde ao linfonodo mesentérico; (LI) corresponde ao linfonodo inguinal

#### 4.8 Estudo da expressão de integrinas nas células T dos órgãos linfóides secundários durante a EAE

As integrinas  $\alpha 4\beta 1$  (CD49dCD29) e  $\alpha L\beta 2$  (CD11aCD18) são amplamente expressas em leucócitos, sendo importantes para a indução da EAE. A  $\alpha 4\beta 1$  é relacionada com a entrada das células Th1 na medula espinhal e no cérebro, e das Th17 na medula, enquanto a  $\alpha L\beta 2$  contribui para a entrada das Th17 no cérebro (ROTHHAMMER *et al*, 2011). Para entender a ação que a administração oral do *L.lactis* produtor de HSP65 exerce nas células que expressam essas integrinas, utilizamos animais no 14<sup>o</sup> dia após a imunização, partindo do princípio de que esse é um momento em que um grande número de células entram no sistema nervoso central. Analisamos o linfonodo cervical (órgão linfóide que drena células do sistema nervoso central) e o baço, órgão que embora em estudos prévios já não seja considerado alvo de migração de células nesse momento (REZENDE *et al*, 2012), ainda representa uma referência de aspectos imunológicos sistêmicos.

Os resultados demonstram uma redução da frequência de células CD49d<sup>+</sup> em dois subtipos celulares no baço (CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>LAP<sup>-</sup> e CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>LAP<sup>-</sup>) e um aumento da frequência de células CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>LAP<sup>+</sup> expressando CD11a, nesse mesmo órgão (figura 9). Neste experimento, os dois marcadores de células T reguladoras (LAP e Foxp3) foram utilizados em uma mesma marcação, o que permite afirmar que, quando nenhum desses estava expresso, não se tratava de células T reguladoras pertencentes a essas subpopulações. Não houve variação nas medianas das intensidades de expressão desses receptores (os valores estão discriminados na tabela 2).



**Figura 9: Estudo da expressão de integrinas em células de órgãos linfóides secundários durante a EAE**

Camundongos C57BL/6 Foxp3/GFP foram tratados com água (grupo “Água+EAE”) ou com *L.lactis* produtor de HSP65 (grupo “HSP65+EAE”) por 5 dias, e 10 dias depois foram imunizados para a indução de EAE. No 14º dia após a imunização, o baço e o linfonodo cervical foram retirados e processados para a extração de células. A citometria de fluxo foi realizada com duas marcações separadas, uma com os anticorpos anti-CD4,-LAP e -CD49d, e outra com anti-CD4, -LAP e -CD11a. Para a análise, foi realizada uma separação de linfócitos dentro do total de eventos analisados, e de CD4 dentro do *gate* de linfócitos. As barras correspondem às médias da frequência de células de 3 a

5 animais por grupo  $\pm$  erro padrão. A análise estatística foi feita pelo teste t de Student. A média do grupo *Naive* é representada como uma linha para referência, não interferindo na estatística. \* Representa  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,1$ ; \*\*\*  $p < 0,01$ . Figuras **(A-C)** Frequência de CD49d em células do baço; **(D-F)** Frequência de CD49d em células do linfonodo cervical; Figuras **(G-I)** Frequência de CD11a em células do baço; Figuras **(J-M)** Frequência de CD11a em células do linfonodo cervical.

**Tabela 2: Expressão das integrinas pelas células dos órgãos linfóides secundários**

CD49d		CD11a	
Água+EAE	HSP65+EAE	Água+EAE	HSP65+EAE
CD4 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>-</sup> LAP <sup>-</sup> (BAÇO) 40.87 $\pm$ 0.2390	CD4 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>-</sup> LAP <sup>-</sup> (BAÇO) 40.64 $\pm$ 0.2759	CD4 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>-</sup> LAP <sup>-</sup> (BAÇO) "331.3 $\pm$ 41.00 N=6"	CD4 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>-</sup> LAP <sup>-</sup> (BAÇO) "319.2 $\pm$ 32.07 N=6"
CD4 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup> LAP <sup>+</sup> (BAÇO) 106.5 $\pm$ 2.021	CD4 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup> LAP <sup>+</sup> (BAÇO) 440.2 $\pm$ 178.7	CD4 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup> LAP <sup>+</sup> (BAÇO) 364.0 $\pm$ 43.47	CD4 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup> LAP <sup>+</sup> (BAÇO) 243.8 $\pm$ 51.43
CD4 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup> LAP <sup>-</sup> (BAÇO) 37.63 $\pm$ 0.4849	CD4 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup> LAP <sup>-</sup> (BAÇO) 37.00 $\pm$ 1.003	CD4 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup> LAP <sup>-</sup> (BAÇO) 439.1 $\pm$ 172.5	CD4 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup> LAP <sup>-</sup> (BAÇO) 274.3 $\pm$ 97.84
CD4 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>-</sup> LAP <sup>-</sup> (LI) 45.57 $\pm$ 1.084	CD4 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>-</sup> LAP <sup>-</sup> (LI) 44.26 $\pm$ 1.196	CD4 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>-</sup> LAP <sup>-</sup> (LI) 428.7 $\pm$ 6.370	CD4 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>-</sup> LAP <sup>-</sup> (LI) 422.3 $\pm$ 22.52
CD4 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup> LAP <sup>+</sup> (LI) 235.2 $\pm$ 12.51	CD4 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup> LAP <sup>+</sup> (LI) 258.0 $\pm$ 17.43	CD4 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup> LAP <sup>+</sup> (LI) 630.2 $\pm$ 15.76	CD4 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup> LAP <sup>+</sup> (LI) 633.9 $\pm$ 19.53
CD4 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup> LAP <sup>-</sup> (LI) 38.38 $\pm$ 1.228	CD4 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup> LAP <sup>-</sup> (LI) 35.74 $\pm$ 0.5744	CD4 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup> LAP <sup>-</sup> (LI) 313.0 $\pm$ 15.30	CD4 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup> LAP <sup>-</sup> (LI) 316.6 $\pm$ 15.40

Os valores correspondem aos MFIs (*Mean Fluorescence Intensity*)  $\pm$  o erro padrão. A análise estatística entre os dois grupos foi feita pelo teste t de Student. Os MFIs foram comparados da mesma maneira que a frequência (em cada órgão, para cada fenótipo celular). (LI) corresponde ao linfonodo cervical.

## 6. DISCUSSÃO

O trabalho de mestrado ao qual esta dissertação se refere, realizado no laboratório de Imunobiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, faz parte de uma série de estudos do nosso grupo de pesquisa visando entender melhor aspectos relativos à imunorregulação, sendo que a tolerância oral tem sido uma das estratégias utilizadas para a obtenção desta. Podem ser citados, entre outros, trabalhos em que a indução da tolerância oral foi utilizada para prevenir manifestações em modelo de colite (SANTOS, 2011) e diabetes tipo I (dados não publicados), ambos com a administração oral do *L.lactis* produtor de HSP65.

Como já mencionado, recentemente nosso grupo publicou um estudo relatando o uso dessa estratégia de tolerância oral no modelo de EAE, sendo comprovada a eficácia do HSP65 produzido pelo *L.lactis* (Rezende et al, 2012). Daí em diante o foco passou a ser o entendimento do mecanismo de ação da proteína HSP65 liberada na mucosa intestinal pela ação dessa bactéria recombinante. Nesse contexto, diversos aspectos foram investigados e constatamos mudanças no perfil de citocinas e de frequência de células efetoras e reguladoras nos órgãos linfóides secundários dos camundongos tratados. Esses resultados, adicionados à depleção das células que expressam a molécula LAP pela administração *in vivo* de um anticorpo monoclonal específico (que impediu o efeito preventivo do tratamento oral), permitiram constatar que as células T reguladoras expressando LAP, principalmente aquelas que não expressam Foxp3, têm papel crucial na prevenção da EAE através do *L.lactis* produtor de HSP65. Partindo dos conhecimentos já adquiridos com esses estudos anteriores, o objetivo desse trabalho de mestrado foi entender a influência que esse mecanismo de tolerância oral tem na medula espinhal de camundongos, e na migração celular que ocorre dos órgãos linfóides secundários até ela.

Em concordância com os resultados obtidos anteriormente, mostramos primeiramente através do índice macroscópico clínico, que os camundongos tratados com o *L.lactis* produtor de HSP65 têm os sinais e sintomas da EAE reduzidos, após a imunização com MOG<sub>35-55</sub>. Para a avaliação das manifestações da doença, não houve necessidade da realização do tratamento com *L.lactis* possuidor de plasmídeo não codificante como controle, pois sua administração oral resulta em

efeitos semelhantes à ingestão de água. Diferentemente do trabalho anterior, observamos redução significativa do índice clínico da doença no grupo HSP65+EAE (em relação ao grupo Água+EAE) apenas nos 3 últimos dias em que ele foi avaliado (enquanto que, no trabalho anterior, essa redução era observada a partir do 8º dia após a indução da doença). Entretanto, a falta de significância estatística nos demais dias pode ser devido a possíveis diferenças de critério dos avaliadores dos dois trabalhos, ou até mesmo na proporção de animais C57BL/6 e C57BL/6 Foxp3/GFP utilizados. Embora esses animais tenham o mesmo fundo genético, foram provenientes de fontes diferentes, como descrito na metodologia. Além disso, já foi demonstrado que nesse modelo experimental a ação do tratamento oral no sistema imune já é iniciada poucos dias após a imunização, independentemente se há diferenças macroscópicas entre os animais tratados ou não (REZENDE *et al*, 2012).

A redução do infiltrado inflamatório e das áreas lesadas na medula espinhal dos animais que recebem o *L.lactis* produtor de HSP65 é uma característica marcante que os diferenciam bem dos animais do grupo Água+EAE. As manifestações clínicas envolvidas nesse modelo de EAE são tipicamente medulares, com uma paralisia ascendente, começando na porção distal do corpo do animal, envolvendo perda de tônus da cauda e posteriormente redução da força nas patas traseiras e, em alguns casos, das patas dianteiras (MULLER; PENDER; GREER, 2000). Portanto, a redução da inflamação na medula espinhal justifica a menor intensidade nos sinais clínicos da doença.

O acometimento da medula espinhal pela EAE, em sua fase aguda (índices macroscópicos mais altos), tipicamente envolve inflamação nos tratos anterolateral (condutor de estímulos nociceptivos, toques grosseiros e termais), posterior (toques finos e propriocepção) e piramidal (que tem relação com condução de impulsos nervosos e execução de movimentos voluntários). Curiosamente, as placas típicas de lesões de EAE são bem menos encontradas nos tratos piramidais da medula espinhal. Os acometimentos motores que ocorrem nos animais, portanto, podem ser devido a um processo neurodegenerativo em uma porção mais proximal desse mesmo trato, pois ele é iniciado no córtex cerebral, percorre o tronco encefálico e vai até os neurônios motores eferentes localizados na substância cinzenta da medula,

de onde os impulsos nervosos são conduzidos aos músculos. Portanto, fica claro que a presença de um infiltrado inflamatório menor e a redução das lesões na medula espinhal dos animais que receberam o *L.lactis* produtor de HSP65, correlaciona-se com a redução das manifestações clínicas da doença (RECKS; ADDICKS; KUERTEN, 2011).

Além da observação da medula espinhal através dos cortes histológicos, para um melhor entendimento da relação entre número de células e índice macroscópico, foram realizadas contagens de células mononucleares e de linfócitos em câmara de Neubauer e por citometria de fluxo, respectivamente. Dentre essas células mononucleares observadas na câmara, provavelmente estavam presentes também as micróglias, que embora façam parte das células da glia, também são leucócitos e têm grande relevância imunológica. Essas células atuam na apresentação antigênica e fagocitose no sistema nervoso central. Alguns autores sugerem que as micróglias podem dar origem à parte das células dendríticas existentes no sistema nervoso (ALMOLDA; GONZALEZ; CASTELLANO, 2011).

Nos três momentos após a imunização em que o número de células e linfócitos foram analisados (4, 10 e 14 dias), a diferença mais significativa entre os grupos foi no 14<sup>o</sup> dia, justamente o momento de maior discrepância entre o índice clínico deles. A redução do número total de células (além de menor número de linfócitos) provavelmente está associada ao menor infiltrado de neutrófilos na medula espinhal, sendo esse tipo celular muito importante para as manifestações da EAE na fase aguda (WU *et al*, 2010)). Quanto aos subtipos de linfócitos, pode-se supor que a principal diferença entre os dois grupos é no número de células CD4<sup>+</sup> produtoras de IL-17 (STROMNES *et al*, 2008; KOMIYAMA *et al*, 2006; ARANAMI; YAMAMURA, 2008), provavelmente reduzida nos animais que receberam o *L.lactis* produtor de HSP65. Os linfócitos Th17 possuem um fenótipo mais instável que os e Th1 e Th2, e muitos deles produzem também IFN- $\gamma$ . Entretanto, tanto os linfócitos produtores unicamente de IL-17 quanto os que também produzem IFN- $\gamma$  são considerados como capazes de infiltrar no sistema nervoso central anteriormente ao início das manifestações da EAE (MURPHY *et al*, 2010). Poucos estudos recentes apontam o contrário, ou seja, que as células Th1 sejam necessárias para modificar

características do sistema nervoso central e torná-lo mais atrativo e acessível para as células Th17 (CONNOR *et al*, 2008).

Em nenhum dos pontos testados houve, entretanto, diferença estatística entre o número de células mononucleares ou linfócitos entre os grupos. Mas o fato de ter havido diferenças estatisticamente significativas, no 14<sup>o</sup> dia após a imunização, na contagem de células analisadas por histologia, bem como nas análises feitas pela técnica de microscopia intravital, é um indício de que o processo de extração celular utilizado na medula espinhal ainda precisa ser melhorado, e que se um N maior do que 3 for utilizado, as diferenças provavelmente aparecerão. O uso da enzima colagenase e de percoll para a obtenção de leucócitos não pode ser descartado como possível causador de morte celular. Além disso, a medula espinhal é envolvida por meninges formadas principalmente por lipídios, o que aumenta a quantidade de resíduos nas amostras obtidas. Todos esses aspectos tornam-se fatores limitantes para a obtenção de amostras com um grau de pureza maior e com um número de células adequado para contagem na câmara de Neubauer e leitura no citômetro de fluxo.

A microscopia intravital foi o método escolhido para a visualização da entrada dos leucócitos na medula espinhal, e assim melhorar o entendimento do padrão de migração celular para esse órgão. Como mencionado por Kim e colaboradores (2010) (KIM *et al*, 2010), a técnica apresenta alguns fatores limitantes, como a necessidade de uma laminectomia e da remoção de fragmentos da coluna vertebral, o que aumenta a chance de possível contaminação e surgimento de lesões nas membranas que envolvem a medula espinhal. Entretanto, nesse trabalho foi possível a realização da microscopia intravital e os resultados foram satisfatórios. Condizente com a literatura, observamos um nível muito baixo de rolamento e adesão de leucócitos nos animais não manipulados (*naive*) (KERFOOT; KUBES, 2002). Interessantemente, com relação a essas duas variáveis, os animais grupo HSP65+EAE apresentaram níveis semelhantes aos animais *naive*.

A redução do rolamento e adesão dos leucócitos nas vênulas pós-capilares indica que a administração oral do *L.lactis* produtor de HSP65 altera aspectos relativos à migração celular para o sistema nervoso central. Nossos resultados mostram também que a aderência das células aos vasos e posterior migração

transendotelial para o parênquima da medula espinhal estão reduzidas nesses animais, o que reduz o infiltrado no órgão. Entretanto, é necessário também um entendimento do perfil celular encontrado no sistema nervoso central dos animais. O trabalho anteriormente a esse no Laboratório de Imunobiologia (REZENDE *et al*, 2012)) e diversos outros (CHEN *et al*, 1994; KOHM *et al* 2002; LIU *et al*, 2006; ZHANG *et al*, 2004) mostraram que as células T CD4<sup>+</sup> reguladoras têm uma importância crucial na prevenção ou supressão da EAE. Por esse motivo estudamos, por citometria de fluxo, a frequência dessas células (consideradas aquelas que expressavam Foxp3 e/ou LAP) na medula espinhal, nos dias 4, 10 e 14 após a imunização. Em todos os momentos, principalmente nos dois últimos, o grupo HSP65+EAE apresentou um leve aumento da frequência dessas células. Tal aumento, entretanto, não foi estatisticamente significativo. A falta de respaldo estatístico para esses dados também pode ser devido às dificuldades próprias à técnica ou à necessidade de um N maior, como já abordado anteriormente.

Dentro do grupo das células T CD4<sup>+</sup> reguladoras, existem fenótipos diferentes, e eles refletem a maneira de atuação de cada subtipo. Na última década, vários trabalhos têm relatado a molécula LAP como um marcador importante de células T reguladoras, e sua ação (via liberação da citocina TGF- $\beta$ ) tem sido associada à prevenção ou supressão de modelos de doenças autoimunes, como a osteoartrite em camundongos velhos (DAVIDSON *et al*, 2005), indução de inflamação renal (WANG *et al*, 2005) e colite (OIDA *et al*, 2003). No caso da encefalomielite autoimune experimental o mesmo tem sido observado. Embora não se possa descartar a importância das células T<sub>reg</sub> propriamente ditas (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) (LIU *et al*, 2006), elas por si só não parecem ser tão efetivas na redução das manifestações da EAE. Experimentos realizados no modelo de EAE dão conta de que as células T<sub>reg</sub> expandem-se com facilidade nos órgãos linfóides e se acumulam no sistema nervoso central, entretanto, sem efetivamente exercer atividade reguladora sobre as células encefalitogênicas que produzem IL-6 e TNF- $\alpha$ , e assim, não impedem as manifestações da doença (KORN *et al*, 2007). Já as células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup>, que expressam elevados níveis de Foxp3 (a principal característica da célula T<sub>reg</sub>), são células reguladoras mais efetivas no controle da EAE, pois exercem funções tanto no contato entre as células (via CTLA-4) quanto na liberação do TGF- $\beta$  solúvel (CHEN *et al*, 2008). Interessantemente, uma estratégia

muito eficaz tanto na prevenção quanto na supressão da EAE, que é o tratamento oral com anticorpos anti-CD3, desencadeia seus efeitos via indução de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>LAP<sup>+</sup> que não expressam Foxp3. (OCHI *et al*, 2006).

No trabalho já realizado com a utilização do *L.lactis* produtor de HSP65 no modelo de EAE (REZENDE *et al*, 2012), também demonstramos uma maior importância das células T reguladoras que expressam LAP. Nos camundongos tratados com *L.lactis* produtor de HSP65, elas tiveram a frequência aumentada nos dias 2 e 4 após a imunização nos linfonodos mesentérico e inguinal, e no dia 4 no baço. Já a frequência e número das células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> expressando Foxp3 só aumentaram no linfonodo inguinal, nos dias 2 e 4. Dessas células expressando LAP, apenas 15% expressavam Foxp3, enquanto o oposto ocorria em 50%. Em suma, esses dados demonstraram uma importância grande das células Th3 (secretoras de TGF- $\beta$  e que expressam LAP), inclusive aquelas que não coexpressavam Foxp3. No presente trabalho, obtivemos resultados semelhantes quanto ao estudo fenotípico das células T reguladoras presentes na medula espinhal, mas esses não foram tão nítidos quanto aqueles obtidos nos órgãos linfóides, e tampouco foram significativos estatisticamente (já discutido).

Extraímos a medula espinhal dos animais nos três tempos após a indução da EAE. Nos dias 4 e 10, que representam, respectivamente, um momento inicial da doença (índice macroscópico baixo e ainda poucas células na medula espinhal) e um momento intermediário (número de células ainda baixo, porém com índice clínico mais alto), as células T CD4<sup>+</sup> reguladoras mais predominantes foram as que expressam Foxp3. Dessas, apenas as que expressam LAP aumentaram no 4<sup>o</sup> dia, e tanto as que expressam ou não LAP aumentaram no 10<sup>o</sup> dia. Já no 14<sup>o</sup> dia (momento com grande infiltrado inflamatório e alto índice macroscópico), o grupo HSP65+EAE teve aumento das células T CD4<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> que expressam ou não Foxp3. Tais resultados são ainda preliminares e não permitem uma conclusão sobre o papel de cada subtipo de célula reguladora nos diversos momentos de desenvolvimento da doença. Porém, analisando em linhas gerais, as células T<sub>reg</sub> CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> parecem chegar antes ao sistema nervoso central dos animais tratados, sendo que as células T reguladoras do tipo Th3 migram posteriormente para esse sítio.

Embora as células T<sub>reg</sub> CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> apresentem um perfil anérgico *in vitro*, elas possuem uma alta capacidade de proliferação *in vivo*, além de uma capacidade supressiva muito alta (CONNOR; MALPASS; ANDERTOM, 2007). Juntando-se a isso a facilidade com que elas conseguem entrar no sistema nervoso central (KORN *et al*, 2007), talvez seja essa uma explicação do porquê é esse tipo de célula reguladora o mais encontrado antes do pico das manifestações da EAE. É possível também pensar que o fato das células expressando Foxp3 não serem encontradas em maior frequência nos órgãos linfóides no grupo tratado com *L.lactis* produtor de HSP65, nos dias 2 e 4 (excetuando o linfonodo inguinal) após a imunização (REZENDE *et al*, 2012), seja decorrente da rápida migração para o sistema nervoso central. As células T reguladoras expressando TGF- $\beta$  podem, inclusive, ter contribuído para esse processo. Essa citocina tem um papel importante para a expressão de Foxp3 em células *naive*, e como os órgãos linfóides secundários dos animais tratados ficaram mais ricos em células Th3, talvez elas foram responsáveis pela indução das células T<sub>reg</sub> CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> que posteriormente chegaram à medula espinhal (YOSHIMURA *et al*, 2010).

No pico das manifestações da doença, foi observada, na medula espinhal dos animais do grupo HSP65+EAE, uma maior frequência das células T CD4<sup>+</sup> reguladoras expressando LAP. Como a maior variação do índice clínico da doença ocorreu exatamente nos três últimos dias avaliados, podemos sugerir que a inibição observada se relaciona ao aumento da frequência das células CD4<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> na medula espinhal. Parte dessas células pode ter sido induzida no próprio sistema nervoso central, pois o aumento da frequência das células T<sub>reg</sub> CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> nesse órgão provavelmente aumentou também a concentração de IL-10 no local, e essa citocina contribui para a expressão de TGF- $\beta$  (WEINER, 2001a). Entretanto, é mais plausível que essas células sejam provenientes, na sua maior parte, dos órgãos linfóides secundários. Provavelmente, o local em que essas células foram primeiramente induzidas foi o linfonodo mesentérico, por ser o órgão linfóide que drena os antígenos ingeridos. A mucosa intestinal é um sítio muito propício para a indução de células T LAP<sup>+</sup> (NAKAMURA; KITANI; STROBER, 2001; OIDA *et al*, 2003; CHEN *et al*, 2008), e essas devem ter posteriormente migrado para outros órgãos linfóides, como o baço, e para a medula espinhal.

Dentre as células T presentes na medula espinhal expressando LAP no 14º dia após a imunização, a grande parte não coexpressa o Foxp3, e a frequência desse tipo celular é aumentado pela administração oral do *L.lactis* produtor de HSP65. Esse tipo de célula T reguladora CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>LAP<sup>+</sup> (a grande parte das células CD25<sup>-</sup> também são Foxp3<sup>-</sup>) é mais comum em camundongos que em humanos (OIDA; WEINER, 2010). A característica regulatória dessa célula é a produção de TGF-β, e portanto, seu mecanismo de ação para a prevenção da EAE ocorre via as ações pertinentes a essa citocina. Dentre elas podem ser citadas o bloqueio da IL-2 e de fatores de transcrição que contribuem para a proliferação celular e para a diferenciação das células Th1 e Th2, NK, células dendríticas, macrófagos e células T CD8<sup>+</sup>, e para a promoção da diferenciação das células T<sub>reg</sub> CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> induzidas (YOSHIMURA *et al*, 2010).

O estudo de parâmetros relativos à migração celular para o sistema nervoso central configura-se como algo de suma importância para o entendimento do resultado obtido pela microscopia intravital e pelas análises das células presentes na medula espinhal. Os receptores de quimiocinas e as integrinas estudadas neste trabalho representam moléculas importantes, cada qual a sua maneira, para facilitar ou até mesmo dificultar com que os leucócitos entrem no sistema nervoso central dos animais, e assim exerçam ou não determinadas atividades.

Dois receptores de quimiocinas foram estudados, o CCR6 e o CXCR3. A escolha desses receptores, ao invés de seus ligantes, é justificada, porque eles são mais expressos nos leucócitos, enquanto os ligantes principalmente nos vasos sanguíneos. O CCR6 é um receptor classicamente descrito como expresso nas células Th17 de camundongos. Seu ligante, o CCL20, é produzido no plexo coróide, e esse eixo CCL20-CCR6 é fundamental para o desencadeamento da EAE (REBOLDI *et al*, 2009). Embora o CCR6 também atue na migração das células T<sub>reg</sub> CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, sua ação acaba sendo mais importante na promoção da doença do que em sua regulação, visto que o desenvolvimento da EAE não ocorre quando esse receptor é depletado (YAMAZAKI *et al*, 2008). Nesse contexto, esse receptor foi estudado no 4º dia após a imunização, no baço e linfonodos mesentérico e inguinal. Dentro do grupo das células CD4<sup>+</sup>LAP<sup>-</sup> (a maioria delas provavelmente pertence ao subtipo de células CD4<sup>+</sup> efectoras) houve uma redução na frequência de

CCR6 no baço e linfonodo inguinal, o que está de acordo com o menor infiltrado inflamatório na medula espinhal do grupo HSP65+EAE. Já entre as T CD4<sup>+</sup> células expressando LAP, tanto a frequência das células CCR6<sup>+</sup> quanto a expressão desse receptor estavam reduzidas, sugerindo que essas células T reguladoras usam outros receptores para migrar para o sistema nervoso central.

O CXCR3 é o receptor das quimiocinas CXCL9, CXCL10 e CXCL11. Ele é expresso em linfócitos T CD4<sup>+</sup>(principalmente Th1) e CD8<sup>+</sup> ativados, células NK, micróglia, monócitos e células dendríticas (GARCIA-LOPEZ *et al*, 2001). Seu ligante CXCL10 é encontrado abundantemente na fase inicial da EAE, e mesmo na esclerose múltipla humana essa quimiocina é muito encontrada nas placas ativas, mais especificamente na região dos astrócitos que a envolvem, enquanto o CXCR3, nos linfócitos T perivasculares (SORENSEN *et al*, 2002). Todos esses fatores fizeram do CXCR3 uma molécula candidata como responsável pela migração de células relacionadas à indução da EAE. Entretanto, um estudo utilizando camundongos geneticamente deficientes para esse receptor demonstrou justamente o contrário. Sua ação protetora no modelo de EAE ocorre porque as células encefalitogênicas que o expressam têm maior dificuldade para entrar no parênquima do sistema nervoso central, restringindo as lesões às regiões perivasculares e impedindo que elas atinjam a substância branca com maior intensidade. Além disso, as células T reguladoras que expressam CXCR3 acabam também se restringindo a essa região, facilitando o contato dessas com as células encefalitogênicas presentes nas lesões perivasculares (MULLER *et al*, 2003). Essa ação reguladora do CXCR3 está de acordo com os resultados obtidos com a administração oral do *L.lactis* produtor de HSP65. Nesse grupo, ele teve a frequência aumentada no baço e linfonodo mesentérico, dentro do grupo das células CD4<sup>+</sup>LAP<sup>-</sup>, sugerindo que elas têm menor probabilidade de atingirem a medula espinhal propriamente dita e exercer atividades lesivas nela. Além disso, sua frequência está muito aumentada nas células reguladoras LAP<sup>+</sup>, no linfonodo inguinal, o que permite supor que elas migrarão até as regiões perivasculares, onde encontrarão as células efetoras expressando esse mesmo receptor, e irão agir de forma anti-inflamatória nesse ambiente, através da liberação de TGF- $\beta$ .

As integrinas foram analisadas no auge das manifestações da doença (14º dia), partindo do princípio que é um período de intenso rolamento e adesão de células no sistema nervoso central, como demonstrado pela microscopia intravital. Das integrinas consideradas importantes para a indução da EAE, destacam-se a  $\alpha 4\beta 1$  e  $\alpha L\beta 2$ . A primeira é também conhecida como VLA-4 (CD49dCD29), e a segunda como LFA-1 (CD11aCD18). Ambas são expressas pelas células T CD4<sup>+</sup> encefalitogênicas e auxiliam na sua entrada no sistema nervoso central (KERFOOT; KUBES, 2002; LASCHINGER *et al*, 2002). Entretanto, existem algumas diferenças, comprovadas por experimentos em que essas moléculas foram depletadas através de anticorpos. Enquanto as células Th1 utilizam preferencialmente a  $\alpha 4\beta 1$  para entrar no sistema nervoso central como um todo, as Th17 utilizam essa integrina para entrar apenas na medula espinhal, enquanto é a  $\alpha L\beta 2$  que normalmente permite que essas células atinjam o cérebro. Portanto, a indução de EAE concomitante com o bloqueio da  $\alpha 4\beta 1$  resulta em uma doença com manifestações mais cerebrais, pois apenas esse órgão pode ser acometido (ROTHHAMMER *et al*, 2011).

As células expressando as integrinas  $\alpha 4\beta 1$  e  $\alpha L\beta 2$  tiveram a frequência analisada através da marcação por anticorpos específicos para as suas subunidades CD49d ( $\alpha 4$ ) e CD11a ( $\alpha L$ ). Dos órgãos linfóides estudados (baço e linfonodo cervical), apenas no baço houve diferenças significativas entre os grupos. Os animais que receberam *L.lactis* produtor de HSP65 tiveram redução na frequência de células CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>LAP<sup>-</sup> expressando CD49d.. Esse resultado pode demonstrar uma possível forma pela qual o tratamento oral atuaria de forma regulatória nesse modelo, pois a redução das células T CD4<sup>+</sup> efetoras expressando essa integrina limita a entrada delas na medula espinhal (tanto as Th1 quanto Th17). É importante observar que, na análise realizada, estão excluídas as subpopulações de células T CD4<sup>+</sup> reguladoras que expressam Foxp3 ou LAP. Embora possa parecer surpreendente encontrar essa diferença justamente no baço nesse ponto da cinética, tal resultado pode ser explicado pelo fato de que no grupo HSP65+EAE, as células CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>LAP<sup>-</sup> (potencialmente efetoras) são justamente as que não foram para o sistema nervoso central, e a redução das células expressando essa integrina pode ser uma das razões pelo qual essas células se mantêm no baço. Houve também uma redução da frequência de células CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>LAP expressando

CD49d. Embora isso a princípio não contribua para a regulação pelo *L.lactis* produtor de HSP65, também não é contraditório, pois no 14<sup>o</sup> dia após a imunização esse tipo celular não está aumentado na medula espinhal. Interessantemente, houve um aumento na frequência de células CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> expressando CD11a também no baço. Dessa forma, não se pode descartar a possibilidade dessas células T reguladoras utilizarem essa integrina para entrar no sistema nervoso central. Além disto, mesmo nesse ponto mais avançado do desenvolvimento da doença, é provável que ainda ocorra migração de células Th3 do baço em direção à medula espinhal.

A relação entre indução de tolerância oral e alterações no recrutamento de leucócitos para sítios inflamados foi explorada recentemente por Rodrigues e colaboradores (RODRIGUES et al, 2006). Em modelo de peritonite experimental induzida por ovalbumina (OVA), os autores demonstraram que camundongos tolerantes à OVA apresentaram uma peritonite significativamente menos acentuada com redução do recrutamento de eosinófilos e neutrófilos para o sítio inflamatório. Houve alterações na expressão de CD54 e de CD18 em linfócitos de camundongos tolerantes sugerindo que a indução de tolerância oral a uma proteína presente no sítio inflamatório pode alterar o padrão de migração de células do sangue circulante para esse local. Assim, o estudo mais detalhado dos mecanismos e moléculas envolvidos na migração de células para os sítios inflamatórios pode esclarecer sobre a ação da tolerância oral na supressão da inflamação.

Baseado nesses resultados e nos anteriormente obtidos (REZENDE et al, 2012), pode-se afirmar que a administração oral do *L.lactis* produtor de HSP65 realmente tem um efeito preventivo no modelo de EAE induzida por imunização com adjuvante e MOG, em animais C57BL/6. Essa ação preventiva deve-se a uma modulação no sistema imunológico desses animais, que reage a essa estimulação antigênica de uma maneira mais regulada. A partir da ingestão do HSP65 por dias consecutivos, em baixas doses, células T<sub>reg</sub> naturais específicas para epitopos presentes no HSP65 (vale lembrar que as HSPs são antígenos dominantes) provavelmente encontram com esse antígeno na mucosa intestinal ou órgãos linfóides secundários, e assim entram em um estado de ativação e possível proliferação. Outro mecanismo de ação desse tratamento oral seria na indução de

células T reguladoras, processo que em grande parte ocorre na mucosa intestinal. Como já mencionado, foi visto que o análogo do HSP65 em mamíferos (HSP60) sinaliza com células apresentadoras de antígenos de forma a aumentar a ação anti-inflamatória delas (ZANIN-ZHOROV *et al*, 2006), o que contribui para a indução de linfócitos T reguladores, tanto os que expressam LAP como Foxp3. Enquanto a supressão mediada pelas células T<sub>reg</sub> em grande parte é antígeno-específica (pois a ligação da molécula coestimulatória CTLA-4 exige uma ligação TCR-MHC), embora essas células também possam secretar IL-10 e causar uma supressão inespecífica em alguns casos, as células Th3 não necessitam se ligar a um MHC apresentando um determinado antígeno, porque elas atuam via liberação de uma molécula solúvel, o TGF- $\beta$ . Esse tipo de efeito regulatório inespecífico pode ser chamado de inibição bystander (MILLER; LIDER; HEINER, 1991) ou efeito indireto da tolerância oral (AZEVEDO, G.M Jr *et al*, 2012). Portanto, a tolerância oral nesse modelo age de maneira imunorregulatória e indireta, impedindo que ocorra uma inflamação significativa no sistema nervoso central dos animais tratados, que dessa forma, conseguem manter-se em uma condição mais próxima do saudável.

## 7. CONCLUSÃO

A realização desse trabalho de mestrado adicionou novos conhecimentos sobre a ação preventiva do *L.lactis* produtor de HSP65 no modelo de EAE, em animais C57BL/6 imunizados com MOG. Foi constatado que a medula espinhal do grupo HSP65+EAE apresenta uma redução significativa dos sinais inflamatórios, o que é correlacionado com um menor índice clínico macroscópico da doença. O perfil celular desse órgão é modificado, com a presença predominante de linfócitos T com fenótipo regulador, quando comparado ao grupo Água+EAE. O tipo celular mais relevante para a prevenção das manifestações da doença parece ser a célula CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup>, cuja frequência estava aumentada exatamente nos dias em que a intensidade dos sinais da EAE difere entre os grupos. Esse efeito induzido pela tolerância oral no sistema nervoso central parece ser devido, entre diversos outros aspectos, a mudanças no padrão de expressão de receptores de quimiocinas (redução da frequência de CXCR3 e CCR6) e integrinas (redução da frequência de  $\alpha\beta 1$  e  $\alpha L\beta 2$ ) nas células T efetoras (não reguladoras) dos órgãos linfóides secundários analisados, que migram em intensidade muito menor para a medula espinhal dos animais tolerantes.

Como perspectiva para os futuros estudos no tema, tentaremos repetir alguns experimentos com um número maior de animais para verificar se algumas das diferenças estatisticamente não significativas até o momento tornam-se mais claras. Além disto, planejamos pesquisar bloquear alguns componentes importantes para o recrutamento leucocitário e verificar o efeito desse bloqueio em camundongos com EAE e também nos previamente tratados com *L.lactis* produtor de HSP65.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMOLDA, B; GONZALEZ, B; CASTELLANO, B. Antigen presentation in EAE: role of microglia, macrophages and dendritic cells. *Front Biosci.* V.16, p.1157-1171, 2011.

ANDALIB, A *et al.* Expression of Chemokine Receptors on Th1/Th2 CD4+ Lymphocytes in Patients with Multiple Sclerosis. *Iran.J.Immunol.* V.8, n.1, p.1-10, mar.2011.

ARANAMI, T; YAMAMURA, T. Th17 Cells and autoimmune encephalomyelitis (EAE/MS). *Allergol Int.* V.57, n.2, p.115-20, 2008.

ASCHENBRENNER, K *et al.* Selection of Foxp3+ regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire+ medullary thymic epithelial cells. *Nature immunology.* V.8, n.4, p.351-358, 2007.

ASCHERIO, A; MUNGER, K.L. Environmental risk factors for multiple sclerosis. part I: the role of infection. *Annals of Neurology.* V.61, n.4, p.288-299, abr.2007a.

ASCHERIO, A; MUNGER, K.L. Environmental risk factors for multiple sclerosis. part II: noninfectious factors. *Annals of Neurology.* V.61, n.6, p.504-513, jun.2007b.

AZEVEDO, G.M Jr *et al.* Indirect Effects of Oral Tolerance Inhibit Pulmonary Granulomas to Schistosomamansoni Eggs. *Clin Dev Immunol.* V.2012, p.1-11, 2012.

AZEVEDO, M.S *et al.* Cytoplasmic and extracellular expression of pharmaceutical-grade mycobacterial 65-kDa heat shock protein in *Lactococcus lactis*. *Genet Mol Res.* V.11, n.2, p.1146-1157, 2012.

BACH, J.F. Infections and autoimmune diseases. *Journal of autoimmunity.* V.25, Sup, p.74-80, 2005.

BAILEY, S.L *et al.* CNS myeloid DCs presenting endogenous myelin peptides 'preferentially' polarize CD4+ TH-17 cells in relapsing EAE. *Nature immunology.* V.8, n.2, p.172-180, fev.2007.

BAILEY-BUCKTROUT, S.L *et al.* Cutting edge: central nervous system plasmacytoid dendritic cells regulate the severity of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. V.180, n.10, p.6457-6461, mai.2008.

BJARTMAR, C; YIN, X; TRAPP, B. Axonal pathology in myelin disorders. *Journal of Neurocytology.* V.28, n.4/5, p.383-395, abr,1999.

BROD, S.A *et al.* Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral administration of myelin antigens: IV. Suppression of chronic relapsing disease in the Lewis rat and strain 13 guinea pig. *Ann Neurol*. V.29, n.6, p.615-622, 1991.

CARRIER, Y *et al.* Th3 cells in peripheral tolerance. I. Induction of Foxp3-positive regulatory T cells by Th3 cells derived from TGF-beta T cell-transgenic mice. *J Immunol*. V.178, n.1, p. 179-85, 2007.

CHEN, M.L *et al.* Latency-Associated Peptide Identifies a Novel CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Regulatory T Cell Subset with TGFβ-Mediated Function and Enhanced Suppression of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol*. V.180, n.11),p.7327–7337, 2008.

CHEN, Y *et al.* Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science*. V.265, n.5176, p.1237-1240, 1994.

COBELENS, P.M *et al.* Dynamics of mycobacterial HSP65-induced T-cell cytokine expression during oral tolerance induction in adjuvant arthritis. *Rheumatology*. V.41, p.775-779, 2002.

COELHO, V; FARIA, A.M.C. HSP60: issues and insights on its therapeutic use as an immunoregulatory agent. *Frontiers in immunology*. V.2, p.1-8, 2012.

COHEN, I.R. Real and artificial immune systems: computing the state of the body. *Nature immunology*. V.7, p.569-574, 2007.

COHEN, I.R; YOUNG, D.B. Autoimmunity, microbial immunity and the immunological homunculus. *Immunology*, V.12, n.4, 1991.

CONNOR, R.A *et al.* Cutting Edge: Th1 Cells Facilitate the Entry of Th17 Cells to the Central Nervous System during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol*. V.181, n.6 p 3750–3754, 2008.

CONNOR, R.A; MALPASS, K.H; ANDERTOM, S.M. The inflamed central nervous system drives the activation and rapid proliferation of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Immunol*. V. 179, n., 958-966, 2007.

COOMBES *et al.* A functionally specialized population of mucosal CD103<sup>+</sup> DCs induces Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med*. V.204, n.8, p.1757-1764, jul.2007.

CORREALE, J; YSRAELIT, M.C; GAITÁN, M.I. Immunomodulatory effects of Vitamin D in multiple sclerosis. *Brain*. V.132, pt.5, p.1146-1160, mar.2009.

DAVIDSON, E.N.B *et al.* Reduced transforming growth factor-beta signaling in cartilage of old mice: role in impaired repair capacity. *Arthritis research & therapy*. V.7, n.6, p.1338-1347, 2005.

DUTTA, R; TRAPP, B.D. Pathogenesis of axonal and neuronal damage in multiple sclerosis. *Neurology*. V.68, p.22-31, mai.2007.

ENGELHARDT, B. Immune cell entry into the central nervous system: Involvement of adhesion molecules and chemokines. *Journal of the Neurological Sciences*. V.274, n.1-2, p.23-36, Nov.2008.

Faria A.M.C *et al.* Aging affects oral tolerance induction but not its maintenance in mice. *Mech Ageing Dev*. V.102, n.1, p.67-80, 1998.

FARIA, A.M.C *et al.* Oral tolerance induced by continuous feeding: enhanced up-regulation of transforming growth factor-beta/interleukin-10 and suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Autoimmun*. V.20, n.2, p.135-45, 2003.

FARIA, A.M.C; WEINER, H.L. Oral Tolerance and TGF- $\beta$  -Producing Cells. *Inflammation & Allergy - Drug Targets*. V.5, n.3, p. 179-190, set.2006a

FARIA, A.M.C; WEINER, H.L. Oral tolerance. *Immunological Reviews*. V. 206, n.1, p 232–259, 2005.

FARIA, A.M.C; WEINER, H.L. Oral tolerance: Therapeutic implications for autoimmune diseases. *Clinical & Developmental Immunology*. V.13, n.2–4, p.143–157, 2006b.

FEDER, M.E; HOFMANN, G.E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol*. V.61, p.243-82, 1999.

FLEMING, J.O; COOK, T.D. Multiple sclerosis and the hygiene hypothesis. *Neurology*. V.67, n.11, p.2085-2086, 2006.

FONTENOT, J.D *et al.* Regulatory T Cell Lineage Specification by the Forkhead Transcription Factor Foxp3. *Immunity*. V.22, n.3, p.329-341, mar.2005.

FRIESSE, M.A; FUGGER, L. Pathogenic CD8<sup>+</sup> T cells in multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, V.66, n.2, p.132-141, ago.2009.

FRISCHER J.M *et al.* The relation between inflammation and neurogeneration in multiple sclerosis brains. *Brain*. V.132, n.5, p.1175-1189, mai.2009.

GANDHI, R; LARONI, A; WEINER, H.L. Role of the innate immune system in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. V.221, n.1-2, p.7-14, abr.2010.

GARCIA-LOPEZ, M.A *et al.* CXCR3 chemokine receptor distribution in normal and inflamed tissues: expression on activated lymphocytes, endothelial cells, and dendritic cells. *Lab Invest*. V.81, n.3, p.409-418, 418.

GEURTS, J.J; BARKHOF, F. Grey matter pathology in multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* V. 7, n.9, p.841-851, set.2008.

GRIFFITHS, I *et al.* Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major proteolipid of myelin. *Science.* V.280, n.5369, p.1609-1613, jun.1998.

HAINES, J.L *et al.* Linkage of the MHC to familial multiple sclerosis suggests genetic heterogeneity. *Human Molecular Genetics*, V.7, n87, p. 1229–1234, 1998.

HART, B.A; GRAN, B; WEISSERT, R. EAE: imperfect but useful models of multiple sclerosis. *Trends in Molecular Medicine.* V.17, n.3, p.119-125, mar.2011.

HAYDAY, A *et al.* Intraepithelial lymphocytes: exploring the Third Way in immunology. *Nat Immunol*, V.2,n.11),p.997-1003, 2001.

HOLMAN, D.M; KLEIN, R.S; RANHOSOFF, R.M. The blood–brain barrier, chemokines and multiple sclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease.* V.1812, n.2, p.220-230, fev.2011.

KAPP, J.A *et al.* Gammadelta T-cell clones from intestinal intraepithelial lymphocytes inhibit development of CTL responses *ex vivo*. *Immunology.* V 111,n.2, p.155-64, 2004.

KAPPOS, L. *et al.* A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *The New England Journal of Medicine*, V.362, n.5, p.1-15, fev.2010.

KE, Y *et al.* Gamma delta T lymphocytes regulate the induction and maintenance of oral tolerance. *J Immunol.* V.158,n.8,p. 3610-8, 1997.

KERFOOT, S.M; KUBES, P. Overlapping roles of P-selectin and alpha 4 integrin to recruit leukocytes to the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2002. V.169, n.2, p.1000-1006, 2002.

KHOURY, S.J *et al.* Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral administration of myelin basic protein: III. Synergistic effect of lipopolysaccharide. *Cellular Immunology.* V.131, n.2, 302–310, 1990.

KIM, J.F *et al.* Two-photon laser scanning microscopy imaging of intact spinal cord and cerebral cortex reveals requirement for CXCR6 and neuroinflammation in immune cell infiltration of cortical injury sites. *Journal of Immunological Methods.* V.352, n.1-2, p.89–100, 2010.

KOHN, A.P *et al.* Cutting Edge: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Regulatory T Cells Suppress Antigen-Specific Autoreactive Immune Responses and Central Nervous System

Inflammation During Active Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal of Immunology*. V.169, n.9, p.4712-4716, 2002.

KOMIYAMA, Y *et al.* IL-17 Plays an Important Role in the Development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol*. V.177, p.566-573, 2006.

KORN, T *et al.* Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nat Med*. V.13, n.4, 423-431, 2007.

LAFAILLE, M.A.C; LAFAILLE, J.J. Natural and Adaptive Foxp3+ Regulatory T Cells: More of the Same or a Division of Labor? *Immunity*. V.30, n.5, p.626-635, jun.2009.

LASCHINGER, M *et al.* Encephalitogenic T cells use LFA-1 for transendothelial migration but not during capture and initial adhesion strengthening in healthy spinal cord microvessels in vivo. *Eur J Immunol*. V.32, n.12, p.3598-3606, 2002.

LASSMANN, H; BRUCK, W; LUCCHINETTI, C.F. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol*. V.17, n.2, p.210-218, abr.2007.

LIU, Y *et al.* Neuron-mediated generation of regulatory T cells from encephalitogenic T cells suppresses EAE. *Nature medicine*. V.12, n.5, p.518-525, 2006.

LOMA, I; HEYMAN, R. Multiple Sclerosis: Pathogenesis and Treatment. *Current Neuropharmacology*. V.9, n.3, p.409-416, set.2011.

MARON, R *et al.* Mucosal Administration of Heat Shock Protein-65 Decreases Atherosclerosis and Inflammation in Aortic Arch of Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice. *Circulation*. V.106, p.1706-1715, 2002.

McDONALD, W.I; RON, M.A. Multiple sclerosis: the disease and its manifestations. *The real society*. V.354, n.1390, p.1615-1622, out.1999.

McFARLAND, H.F; MARTIN, F. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nature immunology*. V.8, n.9, p.913-919, set.2007.

MILLER, A; LIDER, O; HEINER, H.L. Antigen-driven bystander suppression after oral administration of antigens. *J Exp Med*. V.174, n.4, p.791-798, 1991.

MORA, J.R; VON ANDRIAN, U.H. Differentiation and homing of IgA-secreting cells. *Mucosal Immunol*. V.1, n.2, p.:96-109, 2008.

MUCIDA, D. Reciprocal TH17 and Regulatory T Cell Differentiation Mediated by Retinoic Acid. *Science*. V.317, n.5835, p.256-260, jul.2007.

MULLER, D.M; PENDER, M.P; GREER, J.M. A neuropathological analysis of experimental autoimmune encephalomyelitis with predominant brain stem and

cerebellar involvement and differences between active and passive induction. *Acta Neuropathol.* V100, n.2, p.174-182, 2000.

MULLER, M *et al.* CXCR3 signaling reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis by controlling the parenchymal distribution of effector and regulatory T cells in the central nervous system. *J Immunol.* V. 79, n.5, p.2774-2786, 2007.

MURPHY, A.C *et al.* Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Behavior and Immunity.* V.24, n.4, p.641-651, 2010.

MURRAY, T.J. The history of multiple sclerosis: the changing frame of the disease over the centuries. *J Neurol Sci.* V.277, n.1, p.3-8, fev.2009.

NAKAMURA, K; KITANI, A; STROBER, W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med.* V. 194, n.5, p. 629-644, 2001.

OCHI, H *et al.* Oral CD3-specific antibody suppresses autoimmune encephalomyelitis by inducing CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> LAP<sup>+</sup> T cells. *Nat Med.* V.12, n.6, p.627-635, 2006.

OIDA, T *et al.* CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells that express latency-associated peptide on the surface suppress CD4<sup>+</sup>CD45RB high-induced colitis by a TGF-beta-dependent mechanism. *J Immunol.* V 170, n.5, p.2516-2522, 2003.

OIDA, T; WEINER, H.L. TGF- $\beta$  Induces Surface LAP Expression on Murine CD4 T Cells Independent of Foxp3 Induction. *PLoS One.* V.5, n.11, 2010.

PABST, O; MOWAT, A.M. Oral tolerance to food protein. *Mucosal Immunol.* V. 5, n.3, p. 232-239, 2012.

PENDER, M.P; GREER, J.M. Immunology of multiple sclerosis. *Curr. Allergy. Asthma. Rep.* V.7, n.4, p.285-292, jul.2007.

PENNA, G *et al.* Expression of the inhibitory receptor ILT3 on dendritic cells is dispensable for induction of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Blood.* V.106, n.10, p.3490-3497, nov. 2005.

PERÓN, J.P *et al.* Oral tolerance reduces Th17 cells as well as the overall inflammation in the central nervous system of EAE mice. *J Neuroimmunol.* V.227, n.1-2, p.10-17, 2010.

QUINTANA, F.G; COHEN, I.R. The HSP60 immune system network. *Trends in Immunology.* V.32, n.2, p. 89-95, 2010

REBOLDI, A *et al.* C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat Immunol.* V.10, n.5, p. 514-23, 2009.

RECKS, M.S; ADDICKS, K; KUERTEN, S. Spinal cord histopathology of MOG peptide 35–55-induced experimental autoimmune encephalomyelitis is time- and score-dependent. *Neuroscience Letters.* V.494, n.3, p.227-231, 2011.

REIS, B.S; MUCIDA, D. The Role of the Intestinal Context in the Generation of Tolerance and Inflammation. *Clinical and Developmental Immunology.* V.2012, p.1-8, 2011.

REZENDE, R.M *et al.* Hsp65-producing *Lactococcus lactis* prevents experimental autoimmune encephalomyelitis in mice by inducing CD4<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> regulatory T cells. *Journal of autoimmunity.* In press, 2012.

ROCHA, Marta Joana. Disfunção da barreira hematoencefálica em desordens neurológicas: causa ou consequência? 2008-2009. 97f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de Lisboa, Faculdade de Farmácia, Lisboa.

RODRIGUES, *et al.* Systemic effects of oral tolerance on inflammation: mobilization of lymphocytes and bone marrow eosinopoiesis. *Immunology.* V.117, n.14, p.517-525, 2006.

ROTHHAMMER, V *et al.* Th17 lymphocytes traffic to the central nervous system independently of  $\alpha 4$  integrin expression during EAE. *J Exp Med.* V., 208, n.12, p.2465-2476, 2011.

SANTOS, Ana Cristina Gomes. Estratégias alternativas de imuno-modulação nas doenças intestinais. . 2011. 164f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Pós graduação em bioquímica e imunologia, Belo Horizonte.

SCHULZ O *et al.* Intestinal CD103<sup>+</sup>, but not CX3CR1<sup>+</sup>, antigen sampling cells migrate in lymph and serve classical dendritic cell functions. *J Exp Med.* V 206, n.13, p. 3101-3114, 2006.

SMOLDERS, J. *et al.* Vitamin D status is positively correlated with regulatory T cell function in patients with multiple sclerosis. *Plos one.* V.4, n.8, ago.2009.

SORENSEN, T.L *et al.* Multiple sclerosis: a study of CXCL10 and CXCR3 co-localization in the inflamed central nervous system. *J Neuroimmunol.* V.127, n.1-2, p.59-68, 2002.

SOSPEDRA, M; MARTIN, R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu. Rev. Immunol.* V.23, p.683-747, 2005.

STROMNES, I.M et al. Differential regulation of central nervous system autoimmunity by TH1 and TH17 cells. *Nature medicine*. V.14, n.3, mar.2008.

SZCZUCINSKI, A; LOSY, J. Chemokines and chemokine receptors in multiple sclerosis. Potential targets for new therapies. *Acta Neurol. Scand*. V. 115, n.3:p. 137–146, 2007.

TRAPP, B.D; NAVE, K.A. Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder? *Annu Rev Neurosci*. V.31, n.1, p.247-269, 2008.

TSAN, M; GAO, B. Heat shock proteins and immune system. *Journal of Leukocyte Biology*. V,85,p.905-910, 2009.

VAZ, N.M et al. Inhibition of homocytotropic antibody formation in adult inbred mice by previous feeding of protein antigens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*.V.60, p.110-115, 1977.

WANG, W et al. Signaling mechanism of TGF-beta1 in prevention of renal inflammation: role of Smad7. *J Am Soc Nephrol*. V.16, n.5, p.1371-1383, 2005.

WEINER, H.L et al. Oral tolerance. *Immunol Rev*. V.241, n.1, p.241-259, 2011.

WEINER, H.L The Challenge of Multiple Sclerosis: How Do We Cure A Chronicheterogeneous disease? *Annals of Neurology*. V.65, n.3, p.239-248, mar.2009.

WEINER, H.L. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev*.V.182, 207-214, 2001a.

WEINER, H.L. Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes Infect*. V.3, n.11, p.947-954, 2001b.

WORBS, T et al. Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *J Exp Med*. V203,n.3p. 519-27.2006.

WU, F et al. Extensive infiltration of neutrophils in the acute phase of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *Histochem Cell Biol*. V.133, p.313-322, 2010.

YAMAZAKI, T et al. CCR6 Regulates the Migration of inflammatory and regulatory T cells. *J Immunol*. V181, n.12, p.83918-401, 2008.

YANG, I et al. The role of microglia in central nervous system immunity and glioma immunology. *Journal of Clinical Neuroscience*. V.17, n.1, p.6-10, jan.2010.

YIN, X et al. Myelin-Associated Glycoprotein Is a Myelin Signal that Modulates the Caliber of Myelinated Axon. *The Journal of Neuroscience*. V.18, n.6, p.1953-1962, mar.1998.

YOSHIMURA, A *et al.* Cellular and molecular basis for the regulation of inflammation by TGF-beta. *J Biochem*, V.147, n.6, 781-792, 2010.

ZANIN-ZHOROV, A *et al.* Heat shock protein 60 enhances CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cell function via innate TLR2 signaling. *J Clin Invest*. V.116, n.7, p. 2022–2032, 2006.

ZHANG, X *et al.* IL-10 is involved in the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells. *Int Immunol*. V.16, n.2, p.249-56, 2004.