

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

ALLYSSON THIAGO CRAMER SOARES

**Mecanismos reguladores de SOCS2 no Sistema Nervoso Central,
durante a Encefalomielite Autoimune Experimental**

Belo Horizonte

2016

ALLYSSON THIAGO CRAMER SOARES

**Mecanismos reguladores de SOCS2 no Sistema Nervoso Central,
durante a Encefalomyelite Autoimune Experimental**

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

Orientadora: Fabiana Simão Machado

Belo Horizonte

2016

043 Soares, Allysson Thiago Cramer.

Estudo do papel de SOCS2 nas células da glia e sua relação com ativação de células T e o perfil de citocinas secretadas durante o desenvolvimento da Encefalomielite Autoimune Experimental [manuscrito] / Allysson Thiago Cramer Soares. – 2017.

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

Orientadora: Fabiana Simão Machado.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Departamento de Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Esclerose Múltipla. 3. Encefalomielite Autoimune Experimental. 4. Proteínas Supressoras da Sinalização de Citocina. 5. Sistema Nervoso Central. I. Machado, Fabiana Simão. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

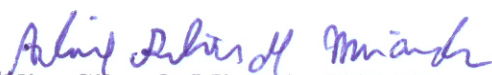
CDU: 577.1

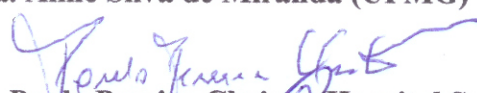


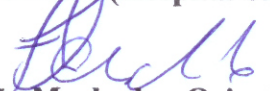
Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE ALLYSSON THIAGO CRAMER SOARES. Aos quatorze dias do mês de fevereiro de 2017 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 do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Mecanismos reguladores de SOCS2 no sistema nervoso central durante 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, Prof. Fabiana Simão Machado, 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 arguição 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. Aline Silva de Miranda (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Paulo Pereira Christo (Hospital Santa Casa - BH), aprovado; Dra. Fabiana Simão Machado - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), 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, 14 de fevereiro de 2017.


 Dra. Aline Silva de Miranda (UFMG)


 Dr. Paulo Pereira Christo (Hospital Santa Casa - BH)


 Dra. Fabiana Simão Machado - Orientadora (UFMG)


 Profª Leda Quêrcia Vieira
 Coordenadora do Curso de Pós Graduação
 em Bioquímica e Imunologia
 ICB - UFMG

Agradecimentos:

Primeiramente venho agradecer a Deus, por me proporcionar a cada dia viver, permitir conhecer pessoas maravilhosas e conviver com elas durante toda essa caminhada até agora. Pela oportunidade de conhecer e compreender um pouco mais sobre a ciência de tudo aquilo o quanto foi criado pela sua grande obra, realizada por Suas mãos.

Especialmente queria agradecer à toda minha família. Principalmente a meus pais, Adriana e Deli e a meu irmão Jonathan Cramer, que ao longo de todos estes anos, foram minha inspiração e incentivo para que eu pudesse chegar até aqui, com a esperança renovada a cada dia e com a certeza de que o apoio deles jamais faltaria em minha vida.

De todo o coração, agradecer à minha orientadora e professora Fabiana Simão Machado, que desde o primeiro dia em que abriu as portas para mim, com sua carisma e seu jeito sereno de lidar com as coisas, tem sido uma inspiração para mim, proporcionando uma amizade, um convívio e um crescimento intelectual de uma forma imensurável.

Aos meus amigos que tem participado desde o início desta etapa da minha vida, e aqueles que recentemente me ajudaram e tornaram cada momento até aqui especiais. A vocês: Adriana Gomes, Ana Carolina, Bia Oliveira, Kaique Lopes, Laíza Alencar. Obrigado pelo apoio, convívio e companheirismo.

Aos amigos de trabalho que desde o início não se demonstraram apenas voluntários aos experimentos e horas de trabalho, mais que transformaram irmãos durante toda a caminhada e até hoje, a eles meus agradecimentos, Bruno Cabral, Diego Rodney, Renata Monti, Paulo Gaio.

Aos colegas de laboratório, que passaram, me ajudaram, e aqueles que ainda permanecem a cada dia, proporcionando um convívio, colaboração e momentos de descontração durante todos esses anos: Ana Carolina, Cynthia Honorato, Fátima Brant, Isabela Avellar, Jacqueline Barbosa, Júlia Castro, Katherinne Manrique, Lísia Esper, Lorrayne Souza, Melisa Gualdrón, Ronan Ricardo e Samuel Porto por toda ajuda e convivência.

Aos colaboradores, pela participação e empenho para conduzir as realizações deste projeto, onde a participação de cada um deles permitiu que chegássemos com grande satisfação até aqui: Bruno Cabral, David Henriques, Mauro Guimarães, Profª Ana Maria, Profº Mauro Martins, Prfª Milene Rachid e a Rafael Rezende.

Aos colegas e os laboratórios que colaboraram, dos grupos da Imunofarmacologia, Imunobiologia, Gnotobiologia e Imunologia, Imunologia e Doenças Infecciosas, Membranas Excitáveis, Microorganismo Hospedeiro.

A todos que participaram de alguma forma desse trabalho.

Aos professores da banca examinadora, Aline Miranda, Paulo Christo e Fabrício Araújo pela disponibilidade e incentivo, que desde já, colaboraram para que pudéssemos chegar nesta etapa de realização deste trabalho.

Às todas as agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG, que foram fundamentais para a realização de toda a pesquisa.

Ao Instituto de Ciências Biológicas e a todos prestadores de serviços da UFMG, que de uma forma importante, colaboraram para que chegássemos juntos até aqui.

Att,

Allysson Cramer

Resumo

Durante os últimos anos a Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE) vem sendo o modelo animal mais amplamente utilizado afim de elucidar e compreender melhor os mecanismos fisiopatológicos da Esclerose Múltipla (EM). Uma doença caracterizada em proporcionar um processo inflamatório exacerbado, gerando um comprometimento e prejudicando o funcionamento do Sistema Nervoso Central (SNC). Mecanismos reguladores da inflamação são extremamente importantes para controlar o perfil inflamatório durante o desenvolvimento da doença. Sabe-se que proteínas denominadas de Supressores da Sinalização de Citocinas (SOCS), tem funções específicas que desempenham uma regulação da resposta de citocinas, contrabalanceando a sinalização e o processo inflamatório em diversas doenças. Um membro da família SOCS, denominado como SOCS2, vem sendo amplamente estudado nos últimos anos, e tem sido classificado não apenas como um supressor, mais como um modulador, por apresentar diversas respostas fisiológicas em vários sistemas do corpo, bem como na patogênese de determinadas doenças infecciosas, alérgicas, cancerígenas e que afetam o SNC. No entanto, pouco se sabe do envolvimento de SOCS2 em doenças autoimunes, bem como no desenvolvimento da EAE. Afim de estudar o papel de SOCS2 na EAE, realizou-se a indução da doença em camundongos C57BL/6 e SOCS2 deficientes ($^{-/-}$), utilizando a glicoproteína da mielina de oligodendrócito (MOG₃₅₋₅₅), Completo Adjuvante de Freund (CFA) e Toxina Pertussis. Após o desenvolvimento da doença, realizou-se análises do cérebro e medula espinhal durante a fase de pico (14º dia após indução - dpi) e na fase de remissão (28 dpi) da doença. Observou-se o aumento da expressão de SOCS2 em cérebro de camundongos C57BL/6 durante o desenvolvimento da doença, sendo que camundongos SOCS2 $^{-/-}$ apresentaram resistência ao aparecimento dos sinais clínicos de fase aguda. Essa resistência foi associada por observar uma menor expressão de IRF1 no cérebro, redução da frequência de células T CD4 inflamatórias (IFN- γ ⁺, IL-17⁺, TNF⁺) e células T CD8 (IFN- γ ⁺, TNF⁺) no cérebro e medula espinhal dos camundongos SOCS2 $^{-/-}$. Porém, após a progressão da doença em camundongos SOCS2 $^{-/-}$, observou-se que na fase de remissão eles eram incapazes de se recuperarem dos sinais clínicos causados pelo processo de desmielinização e dos danos causados no SNC durante a fase aguda. Diante da dupla resposta observada por SOCS2 durante o desenvolvimento da doença,

infe-re-se que SOCS2 é importante para impulsionar o estabelecimento e o início da fase aguda, mas tem um papel fundamental na recuperação da deficiência locomotora, além de controlar as lesões causadas no SNC durante a EAE.

Palavras-chave: Esclerose Múltipla, Encefalomielite Autoimune Experimental, Supressor da Sinalização de Citocinas 2, Sistema Nervoso Central.

Abstract

In recent years, Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) has been the most widely used animal model to elucidate and better understand the pathophysiological mechanisms of Multiple Sclerosis (MS). A disease characterized in providing an inflammatory process exacerbated, generating a compromising and damaging The functioning of the Central Nervous System (CNS). Regulatory mechanisms of inflammation are extremely important to control the inflammatory profile during the development of the disease. It is known that proteins called Cytokine Signaling Suppressors (SOCS) have specific functions that regulate cytokine responses, counterbalancing the signaling and inflammatory process in several diseases. A member of the SOCS family, known as SOCS2, has been extensively studied in recent years, and has been classified not only as a suppressor, but as a modulator, because it presents diverse physiological responses in various body systems as well as in the pathogenesis of certain Infectious, allergic, cancerous and CNS-affecting diseases. However, little is known about the involvement of SOCS2 in autoimmune diseases, as well as the development of EAE. In order to study the role of SOCS2 in EAE, disease induction in C57BL / 6 and SOCS2 deficient mice ($^{-/-}$) was performed using oligodendrocyte myelin (MOG35-55), Complete Freund's Adjuvant (CFA) and Pertussis toxin. After the development of the disease, analyzes of the brain and spinal cord were performed during the peak phase (14th day after induction - dpi) and in the remission phase (28 dpi) of the disease. Increased expression of SOCS2 in the brain of C57BL/6 mice during disease development was observed, whereas SOCS2 $^{-/-}$ mice showed resistance to the appearance of acute phase clinical signs. This resistance was associated with reduced brain IRF1 expression, reduced inflammatory CD4 (IFN- γ^+ , IL-17 $^+$, TNF $^+$) and CD8 (IFN- γ^+ , TNF $^+$) T cells in the brain and spinal cord Of the SOCS2 $^{-/-}$ mice. However, following disease progression in SOCS2 $^{-/-}$ mice, it was observed that in the remission phase they were unable to recover from the clinical signs caused by the demyelination process and CNS damage during the acute phase. Given the double response observed by SOCS2 during the development of the disease, it is inferred that SOCS2 is important for boosting the onset and onset of the acute phase, but it plays a key role in the recovery of locomotor deficiency, in addition to controlling the CNS lesions during EAE.

Key words: Multiple Sclerosis, Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, Suppressor of Cytokine Signaling 2, Central Nervous System.

Lista de abreviaturas

EM = Esclerose Múltipla

SNC = Sistema Nervoso Central

HLA = Antígeno Leucocitário Humano (*Human Leucocyte Antigen*)

EF1 = Esfingosina Fosfato 1

BHE = Barreira Hemato-encefálica

RR = Recidivante-remitente

PP = Primário-Progressivo

PR = Progressiva-recidivante

IRM = Imagens de Ressonância Magnética

EAE = Encefalomielite Autoimune Experimental

CFA = Completo Adjuvante de Freund (*Freund's Complete Adjuvant*)

PLP = Proteína de Proteolipídeo (*Proteolipid protein*)

MOG = Proteína de Oligodendrócito de Mielina (*Myelin Oligodendrocyte Protein*)

SP = Secundária-progressiva

APC = Célula apresentadora de antígeno (*antigen presenting cell*)

DC = Célula dendrítica (*dendritic cell*)

cDC = Célula dendrítica convencional (*conventional dendritic cell*)

pDC = Célula dendrítica plasmocitóide (*plasmocitoid dendritic cell*)

IL = Interleucina

CCL = Quimiocina motivo C-C ligante (*Chemokine (C-C motif) ligand*)

Th = Células T auxiliares / T helper cell

MHCII = Complexo de histocompatibilidade principal (*major histocompatibility complex II*)

CD = Cluster de diferenciação (*Cluster of differentiation*)

LCR = Líquido Cefalorraquidiano

Treg = Células T reguladoras

CTLA-4 = Célula T citotóxica associada a proteína 4 (*cytotoxic T lymphocyte associated protein 4*)

GITR = Proteína relacionada ao receptor de necrose tumoral induzido por glicocorticoide (*glucocorticóide glucocorticoid-induced tumour-necrosis-factor-receptor-related protein*)

$\alpha E\beta 7$ = Integrina $\alpha E\beta 7$

JAK = Janina quinase (*Janus kinase*)

STAT = Sinais transdutores e ativadores de transcrição (*signal transducers and activators of transcription*)

SOCS = Proteína supressora da sinalização de citocinas (*suppressor of cytokine signalling*)

TLR = Receptores do tipo Toll (*toll-like receptors*)

GH = Hormônio do crescimento (*growth hormony*)

IGF1 = Fator de crescimento semelhante a insulina 1 (*Factor growth insulin 1*)

CP = Câncer de próstata

TNF = Fator de Necrose tumoral (*Tumour necrosis fator*)

IFN- γ = Interferão gama (*Interferon gama*)

iTregs = Células T reguladoras induzidas

LES = Lúpus Eritomatoso Sistemico

AR = Artrite reumatoide

PBMCs = Células mononucleares de sangue periférico

mRNA = Ácido ribonucleico mensageiro

LXA4 = Lipoxina – A4

EDSS = Escala de Status de Incapacidade Expandida (*Expanded Disability Status Scale*)

CEBIO = Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais

DBCA = Diretriz Brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos

CEUA = Comissão de Ética no uso de animais

LPS = Lipopolissacarídeo

ATP = Adenosina trifosfato

EDTA = Ácido etilenodiamino tetra-acético (*Ethylenediamine tetraacetic acid*)

DMEM = Meio de Eagle modificado por Dulbecco (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)

SJL = Swiss Jim Lambert

NaCl = Cloreto de sódio

HCl = Ácido clorídrico

DTT = Ditiotreitól (*dithiothreitol*)

PMSF = Fluoreto de fenilmetilsulfonilo (*phenylmethylsulfonyl fluoride*)

NaF = Fluoreto de sódio (*Sodium Fluoride*)

TCR = MOG = células T específicas para MOG (*T cell receptor for MOG*)

Lista de figuras

Figura 1. Prevalência Global da EM em 2013.....	18
Figura 2. Sinalização, ativação de células T e o desenvolvimento da autoimunidade no SNC	29
Figura 3. Estruturas das proteínas SOCS	33
Figura 4. Mecanismos de inibição da sinalização de citocinas por proteínas SOCS.....	34
Figura 5. Expressão da proteína SOCS2 no cérebro de camundongos após a indução da EAE.	45
Figura 6. Expressão da proteína SOCS2 em cultura de células da glia após estímulo com epítomos de mielina.	46
Figura 7. Sintomatologia e o desenvolvimento da EAE em camundongos C57BL/6 e SOCS2-/-	47
Figura 8. A ausência de SOCS2 resulta em menor debilidade motora nos camundongos SOCS2-/- durante a fase de pico da doença.....	48
Figura 9. Camundongos SOCS2-/- apresentam menor infiltrado celular e redução da inflamação no SNC durante a fase de pico da EAE.....	50
Figura 10. Expressão da proteína SOCS2 em células da Glia após estímulo com fatores liberados por esplenócitos ativos para EAE.	52
Figura 11. SOCS2 regula a expressão de IRF-1 durante EAE.	53
Figura 12. A ausência de SOCS2 leva a incapacidade de recuperação dos sinais clínicos-	54
Figura 13. A deficiência de SOCS2 impossibilita a recuperação locomotora por completo durante a fase de remissão.	55
Figura 14. A ausência de SOCS2 em camundongos leva a um elevado nível de inflamação no SNC durante fase de remissão da EAE.	56
Figura 15. Camundongos SOCS2-/- apresentam redução na geração e expansão de populações de células T CD4 e CD8 no baço durante as fases de pico e de remissão da doença.	57
Figura 16. A expressão de SOCS2 regula o infiltrado de linfócitos T no SNC durante a fase de pico da doença	59

Figura 17. A população de linfócitos T CD8 tem uma frequência maior na medula espinhal de animais SOCS2 ^{-/-} na fase de pico e de remissão.....	60
Figura 18. SOCS2 ^{-/-} aumenta a expansão de células Treg na fase de remissão, porém não é aumentada no SNC	62

Sumário

1. Introdução	17
1.1. Esclerose Múltipla	17
1.2. Encefalomielite autoimune experimental (EAE)	21
1.3. Semelhanças e diferenças entre EAE e EM	23
1.4. Processo inflamatório durante a EM e a EAE	25
1.5. As células T e o desenvolvimento da doença	27
1.6. Supressor da sinalização de citocinas (SOCS).....	31
1.7. Mecanismos e funções de SOCS2.....	34
2. Objetivos	38
2.1. Objetivo geral	38
2.2. Objetivos específicos.....	38
3. Material e métodos	39
3.1. Animais.....	39
3.2. Indução e avaliação dos sinais clínicos da EAE	39
3.3. Histologia.....	40
3.4. Western Blotting	41
3.5. Citometria de fluxo.....	41
3.6. Cultura primária de glia	42
3.7. Quimeras	43
3.8. Co-cultura de cultura primária de Glia com sobrenadante de esplenócitos de camundongos naïve ou induzidos com EAE.....	43
3.9. Análises estatísticas	44
4. Resultados.....	44
4.1. Expressão de SOCS2 no SNC durante o desenvolvimento da EAE	44
6.2 O estímulo com MOG leva a expressão de SOCS2 em células da glia	45
6.3 A ausência de SOCS2 retarda o aparecimento dos sinais clínicos da doença durante o desenvolvimento da EAE	46

6.4	A ausência de SOCS2 reduz a debilidade locomotora durante a fase de pico da doença.....	47
6.5.	SOCS2 orchestra o infiltrado celular e a inflamação no SNC durante a fase aguda de EAE.....	48
6.6.	Fatores liberados pelas células T de esplenócitos são capazes de aumentar a expressão de SOCS2 no SNC.....	51
6.7.	A expressão do Fator Regulatório de Interferon 1 (IRF-1) é regulada por SOCS2 durante EAE.....	52
6.8	SOCS 2 é essencial para a recuperação dos sinais clínicos durante a fase de remissão da doença.....	53
6.9.	A ausência de SOCS2 acarreta em uma paralisia crônica dos membros inferiores.....	54
6.10	O infiltrado celular e o perfil inflamatório aumenta na ausência de SOCS2 no SNC	55
6.11	A deficiência de SOCS2 leva a uma redução na geração/expansão de células T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ no baço	56
6.12	Camundongos SOCS2 ^{-/-} apresentam um menor perfil e infiltrado de células T inflamatórias no SNC	57
6.13	Células T CD8 produtoras de TNF está aumentada na medula espinhal durante a fase de pico e de remissão da doença	60
6.14	O baço deficiente de SOCS2 produz mais linfócitos T IL-17 ⁺ e FoxP3 ⁺ na fase tardia de EAE.....	61
7	Discussão	65
8	Conclusões	73
9	Referências Bibliográficas	74

1. Introdução

1.1. Esclerose Múltipla

A esclerose múltipla (EM) é uma doença autoimune caracterizada por desencadear um processo inflamatório, desmielinização, degeneração axonal bem como falhas no processo de reparo no Sistema Nervoso Central (SNC) (GRIGORIADISA, PESCHB, 2015). A doença foi primeiramente descrita pelo Neurologista Jean-Martin Charcot (1825-1893) a 14 séculos atrás. Apesar de Charcot ter tido um papel importante no ramo na Neurologia, seus grandes achados proporcionaram para que nos dias de hoje pudesse ser homenageado como o pai da Neurologia. Ele fez as primeiras conexões definitivas entre os sintomas da EM e as alterações patológicas observadas em amostras “post-mortem”, fazendo sua descrição detalhada em 1868 (descrita como “*La sclérose en plaques*”), acompanhado dos primeiros desenhos, ilustrando as expansões das lesões dos ventrículos para os hemisférios cerebrais, proporcionando assim a primeira visão da patologia envolvendo tanto o cérebro como a medula espinhal. Seus achados foram cruciais no desenvolvimento de critérios de diagnósticos da doença, bem como na identificação de muitas características histológicas importantes como a perda de mielina (LUBLIN, 2005; KUMAR *et al.*, 2011).

Apesar de ainda não se saber claramente qual o fator limitante responsável pelo desencadear da doença, estudos tem demonstrado que a autoimunidade desempenha um papel importante na etiologia da doença. Ao longo dos anos tem sido mostrado que existem fatores que contribuem para a predisposição e desenvolvimento de doenças autoimunes, como na EM, que surgem a partir de complexas interações entre a predisposição genética (como o gene para HLA - *Human Leucocyte Antigen*: Antígeno Leucocitário Humano), estilo de vida e fatores ambientais. Dentre os fatores ambientais e estilo de vida estão: alta latitude, sexo feminino, tabagismo, níveis baixos de vitamina D causados pela insuficiente exposição ao sol e/ou ingestão alimentar e infecção pelo vírus Epstein-Barr (EBV) (CORREALE, GAITÁN, 2015; OLSSON, BARCELLOS, ALFREDSSON, 2016). Atualmente, fortes evidências tem apontado a obesidade como um risco para o desenvolvimento da EM. (GUERRERO-GARCÍA *et al.* 2016; OLSSON, BARCELLOS, ALFREDSSON, 2016). Estudos recentes, vem mostrando que a microbiota

intestinal também está diretamente relacionada com a predisposição à doença, onde estudos avaliando a microbiota fecal em pacientes com EM apresentaram uma disbiose na microbiana intestinal (BUDHRAM, 2016; CHEN et al., 2016).

Estudos epidemiológicos têm sido extremamente importantes na tentativa de compreender a natureza, contribuição e a interação dos fatores predisponentes na susceptibilidade para a doença (RAMAGOPALAN, SADOVNICK, 2011). Dados mostram que de 2011 a 2013 ocorreu um aumento de 2,1 para 2,3 milhões de pessoas com a doença. Mostrando que a média de prevalência das regiões com maior prevalência gira em torno de 100 casos a cada 100.000 habitantes como na figura apresentada abaixo (BROWNE *et al.*, 2014).

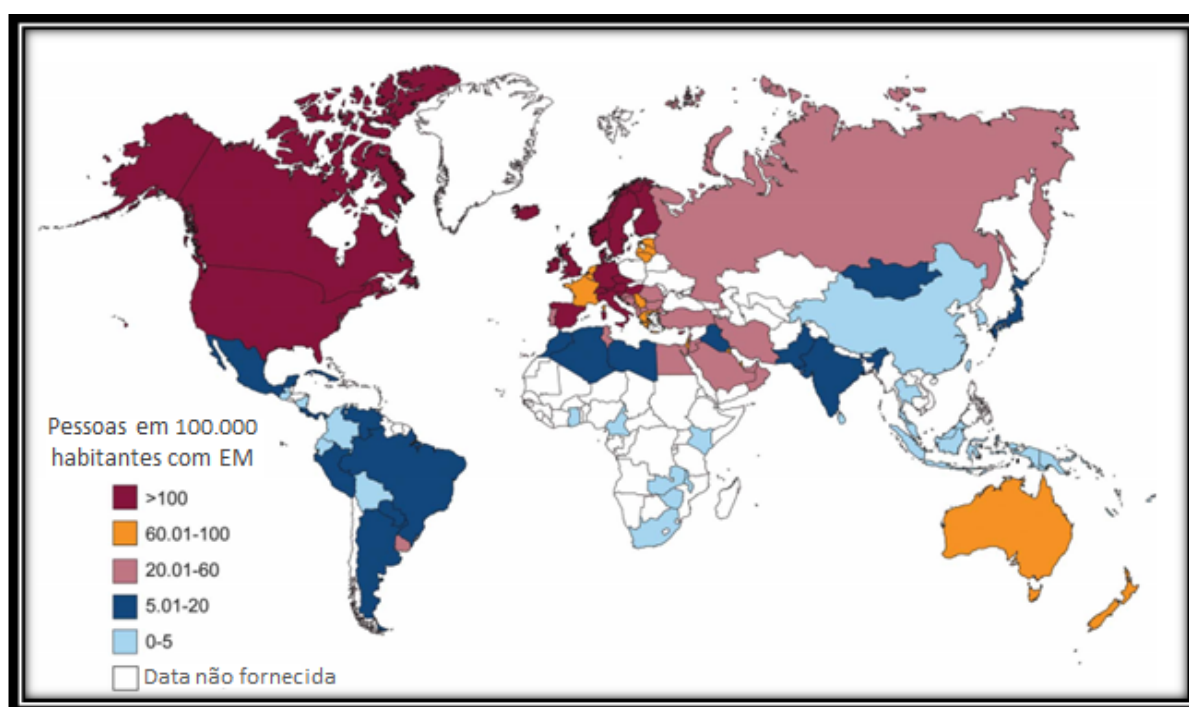


Figura 1. Prevalência Global da EM em 2013 (Adaptado de Browne *et al.*, 2014)

A incidência e prevalência da EM em regiões de clima temperado aumentam em relação a latitude. O exemplo mais claro desse efeito é observado na Austrália. Estudos a 18 anos atrás já mostravam uma alta prevalência na cidade de Hobart, que chegava a

75,6 por 100.000 habitantes, em comparação com uma prevalência de 11 por 100.000 habitantes na região no norte de Queensland (Hammond *et al.*, 1988). Estudos nos dias atuais mostram que a prevalência aumentou ao longo do tempo em algumas regiões e tendo uma relação também com a etnia, como na própria Austrália que já estima-se 125 casos por 100.000 habitantes, sendo que na África do Sul chega a ser 0,22 casos por 100.000 habitantes e em Taiwan 3,67 casos por 100.000 habitantes (MAKHANI *et al.*, 2014). Entretanto, existem padrões mais complexos de distribuição em relação à doença, que precisam ser investigados. Estudos recentes mostraram que a prevalência de EM na América do Sul são menores em relação aos países desenvolvidos mostrando uma taxa de prevalência variando de 1,48 a 17 por 100.000 habitantes, no entanto mais estudos devem ser realizados nas populações em geral, onde a doença tem sido raramente relatada ou classificadas como inexistente. (CHRISTIANO, PATRUCCO, 2008; ABAD *et al.*, 2010). Já no Brasil 19 estudos fizeram referência a taxas de prevalência que variaram de 1,36 a 27,2 por 100,000 habitantes (GAMA PEREIRA *et al.*, 2015). Mesmo apesar da distribuição geográfica da EM podendo também ser explicada por fatores relacionados a etnia e genéticos, a latitude continua sendo um dos maiores fatores de risco da doença (RAMAGOPALAN, SADOVNICK, 2011; MAKHANI *et al.*, 2014).

Dados apontam que o desenvolvimento e aparecimento dos sinais clínicos da doença ocorre entre os 20-50 anos, tendo uma idade média de início aos 30 anos (MILO, MILLER, 2014). Estudos mostram que as mulheres têm maior susceptibilidade à doença, enquanto os homens têm uma pior progressão dela, sendo que estas duas características da doença estão diretamente influenciadas pelo sistema imunológico e pelo sistema nervoso (GOLDEN, VOSKUHL, 2016). A diferença em relação entre mulheres e homens chega há uma proporção de 2:1 para 3:1 dependendo da região geográfica e tem observado um aumentado nas últimas décadas (KOCH-HENRIKSEN, SORENSEN, 2010). Porém recentemente tanto em modelo animal como em mulheres portadoras da doença, foi mostrado que a sua prevalência é maior devido a uma maior expressão do receptor de esfingosina fosfato 1 (EF1), molécula importante na regulação da permeabilidade da Barreira Hemato-encefálica (BHE) em regiões do Sistema Nervoso Central (SNC) (ORENGO *et al.*, 2014).

As alterações neurológicas no SNC causadas pela desmielinização, perda axonal e gliose levam ao aparecimento de sintomas e sinais que incluem parestesias ou dormência, fraqueza motora, distúrbios visuais monoculares, diplopia, dificuldade na coordenação motora, distúrbios da marcha, tonturas e vertigens, podendo acompanhar de disfunções urinárias, até alterações emocionais, dentre outras (MILO, MILEER, 2014). No entanto, apesar do curso da doença e a sintomatologia ser altamente variável, a doença pode ser classificada em 4 cursos clínicos diferentes (LUBLIN *et al*, 2014; MILO, MILEER, 2014; DENDROU, FUGGER, FRIESE, 2015). Dentre eles estão:

- Recidivante-remitente (RR): é classificado por apresentar sintomas neurológicos recorrentes e sinais com recuperação total ou parcial, apresentando uma falta de progressão da doença entre as recaídas. Esse tipo representa aproximadamente 80-85% dos diagnósticos iniciais da EM. Este curso coincide com inflamação e desmielinização do SNC focal, que são tipicamente discerníveis, usando ressonância magnética através da observação de lesões de substância branca.
- Primário-progressivo (PP); é caracterizado pela progressão da doença desde o início das fases caracterizadas como platôs, apresentando pouca ou nenhuma remissão/melhora durante o curso progressivo da doença. Aproximadamente 10-15% dos pacientes com EM apresentam esse subtipo.
- Secundária-progressiva (SP): apresenta seguimento do curso inicial de doença como RR, seguindo por progressão com ou sem recaídas ocasionais. Apresenta remissões menores, permanecendo por fases platôs. Aproximadamente 50% dos pacientes de RRMS progridem para o subtipo SPMS após 10 anos e 90% após aproximadamente 25 anos. Neste curso as lesões inflamatórias deixam de ser características e o declínio neurológico progressivo é acompanhado por atrofia do do volume cerebral e aumento da perda axonal no SNC (MILO, MILEER, 2014; DENDROU, FUGGER, FRIESE, 2015).
- Progressiva-recidivante (PR): este curso clínico é classificado quando a doença apresenta um acúmulo progressivo de incapacidade neurológica desde o início dos sintomas, com intensos e nítidos ataques agudos, sendo os períodos entre as recaídas caracterizados por progressão contínua (LUBLIN *et al*., 2014; MILO, MILEER, 2014).

Apesar de ainda não ter no cenário mundial uma cura para a EM, nos últimos 20 anos foram aprovados oito diferentes compostos moduladores da doença para a tratar pacientes com o curso RR. Atualmente existem 4 medicamentos utilizados como primeira linha de tratamento. Dentre eles estão o Interferon beta, Acetato de Glatiramer, Fumarato de Dimetilo, Teriflunomida. Os de segunda linha se encontram Natalizumabe, Fingolimode, Alentuzumabe, Mitoxantrone, dentre outros (GAJOFATTO, BENEDETTI, 2015; TORKILDSENA, MYHRA, BØA, 2016). A opção de tratamento ideal seria o tratamento mais seguro que elimina evidências clínicas e radiológicas da atividade da doença, porém a maioria dos pacientes iniciam com uma terapia de primeira linha, mas podem passar rapidamente para uma medicação mais potente de segunda linha, quando evidências da atividade de doença apresentam recaídas e/ou incapacidade acumulada, com ou sem novas lesões observadas por Imagens de Ressonância Magnética (IRM) (HAUSER S. L.; CHAN J.R.; OKSENBERG, 2013, TORKILDSENA, MYHRA, BØA, 2016). Apesar de serem tratamentos bastante caros, dados explorando os custos diretos e indiretos no tratamento da EM no Brasil, mostrou chegar a um valor anual de R\$ 22,648,12 por paciente em relação a medicações específicas (imunomoduladoras e imunossupressores) (FINKELSZTEIN, 2013).

Mesmo através de grandes avanços obtidos no conhecimento, como nas implementações de terapias contra a doença e em estudos envolvendo pacientes, como na pesquisa através da utilização de modelos animais susceptíveis a doença, ainda há grande necessidade de compreender melhor os mecanismos da doença, bem como, buscar novas estratégias terapêuticas mais sensíveis e promissoras, afim de melhorar as estratégias terapêuticas já estabelecidas, reduzindo os efeitos colaterais e potencializando a eficácia das mesmas.

1.2. Encefalomielite autoimune experimental (EAE)

Vários modelos de desmielinização em experimento animal tem sido implantados ao longo dos anos para tentar compreender melhor a patologia da EM. Dentre os principais modelos implantados incluem: o modelo de desmielinização induzida por

produtos químicos (cuprizona, brometo de etídio ou lisolectina); o de infecções que promovem desmielinização como a do Vírus da Encefalomielite Murina de Theiler (TMEV) ou o vírus da hepatite murina (RODRÍGUEZ, 2007); pela utilização de animais transgênicos que expressam constitutivamente citocinas como TNF (PROBERT *et al.*, 1995); ou através da utilização de toxina diftérica que leva a uma destruição de mielina em oligodendrócitos (BUCH *et al.*, 2005). No entanto, o modelo bem mais aceito para o estudo da EM e que mais se aproxima das características fisiopatológicas da doença, tem sido a Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE) (GOVERMAN, 2009; CONSTANTINESCU *et al.*, 2011).

O modelo da EAE, foi primeiramente compreendido por Thomas Rivers em 1933, que descobriu que a inoculação de até 85 injeções de emulsão cerebral de coelhos aplicadas em macacos Rhesus resultavam em uma debilidade locomotora e fraqueza nos animais. Quando observara a análise histológica de seus cérebros, observou-se infiltrados perivasculares e desmielinização (RIVERS, SCHWENTKER, 1935). Em outros experimentos Rivers percebeu que coelhos que receberam até 26 injeções do extrato de cérebro de coelho desenvolveram títulos de anticorpos específicos para o cérebro, sendo que uma proporção de coelhos, também desenvolviam paralisia ascendente. Compreendendo assim que quanto mais antigênico contido na emulsão administrada, maior era o título de anticorpos e maior a proporção de coelhos afetados (SCHWENTKER, RIVERS, 1934). Abner Wolf e colaboradores posteriormente, descobriram que a utilização de adjuvante completo de Freund (CFA), descrito anteriormente por Freund e MatDermott em 1942, onde com apenas 1 mL de extratos de cérebro de coelho adulto em macacos Rhesus, já demonstravam o aparecimento dos sinais clínicos da doença após 17 a 62 dias da indução da doença, onde foi observado características do curso RR, onde um animal aparentemente cego poderia recuperar sua visão dentro de alguns dias, podendo também perdê-la novamente, concomitantemente podendo ocorrer uma recuperação de um membro e afetar a paralisia de outro (WOLF, KABAT, BEZER, 1947).

As grandes descobertas obtidas sobre a EAE, possibilitaram identificar não só a produção de anticorpos, como também de células direcionadas a proteína de mielina durante o desenvolvimento da doença. Como os peptídeos específicos de mielina que

nos dias de hoje substituiriam a utilização dos extratos cerebrais para a indução da doença (BAXTER, 2007). Basicamente existem dois tipos de indução da EAE:

- 1) EAE ativa - são necessários para indução proteínas intactas ou peptídeos de uma das três proteínas de mielina - proteína proteolípídica (PLP), glicoproteína de oligodendrócitos de mielina (MOG) e proteína básica de mielina (MBP).
- 2) EAE passiva - que consiste na transferência adotiva de linfócitos ativados contra a mielina *in vitro*, a partir de camundongos imunizados. A indução de EAE por este método normalmente resulta em uma doença mais grave, com maior incidência e um curso de doença mais acelerada e síncrona (MILLER, KARPUS, DAVIDSON, 2007).

A EAE tem sido crucial para melhor compreensão da EM. Com uma neurofarmacologia complexa, muitos dos fármacos que estão em uso atual ou iminente na EM têm sido desenvolvidos, testados ou validados com base em estudos neste modelo (CONSTANTINESCU *et al.*, 2011).

1.3. Semelhanças e diferenças entre EAE e EM

Dentro das principais características na EM pode-se observar diversas semelhanças e diferenças na fisiopatologia dentro do modelo da EAE. Uma das similaridades mais importante é que a EAE leva a uma aproximação das principais características patológicas da EM: inflamação, desmielinização, perda axonal e gliose (CONSTANTINESCU *et al.*, 2011).

Durante o desenvolvimento e progressão da EAE e da EM, uma variedade de células que representam o sistema imune inato e adaptativo, levam a ativação da autoreatividade de células T específicas para mielina que rompem a barreira hematoencefálica (BHE) e invadem o parênquima cerebral. As células gliais residentes também são ativadas desempenhando também um papel importante na patogênese. Alguns dos tipos de células envolvidos são pró-inflamatórios e promovem desmielinização, dano axonal e formação de placas da doença, enquanto outros tipos de

células têm propriedades anti-inflamatórias e/ou reguladoras, capaz de inibir a progressão da doença, facilitando assim o reparo tecidual (DUFFY, LEES, MOALEN-TAYLOR, 2014; TERRY, IFERGAN, MILLER, 2016).

Dependendo do tipo genético do camundongo e do antígeno utilizado na indução da EAE, é capaz de gerar diversos tipos de fenótipos similares à EM. Por exemplo, a indução utilizando PLP induz uma EAE de curso RR em camundongos de linhagem SJL (Swiss Jim Lambert), enquanto que utilizando MOG desencadeia uma EAE crônica progressiva em camundongos C57BL/6. O cruzamento de camundongos C57BL/6, que sobre-expressam receptores de células T específicas para MOG (TCR-MOG) com camundongos com células B específicas para MOG, resultaram numa forma grave de EAE com lesões inflamatórias de nervos ópticos e na medula espinhal. Já camundongos transgênicos para TCR-MOG cruzados para o fundo SJL, desenvolvem um curso RR na EAE com episódios que alteram entre o nervo óptico, o cerebelo e a medula espinhal (SINGHAL, SRIVASTAVA, 2012).

Contudo, várias limitações podem ser observadas entre a EM e a EAE. Uma limitação consistente é a linha de tempo de detecção de sinais clínicos e de intervenções terapêuticas. Considerando que na EAE os processos patológicos podem ser observados dentro de semanas e até mesmo dias após a indução, no qual as abordagens de tratamento podem ser iniciado ainda na fase pré-clínica, sendo que as medidas de diagnóstico na EM não é capaz de detectar os processos fisiológicos subjacentes à doença e depende do aparecimento dos primeiros sinais clínicos, sendo que a intensidade do tratamento aumenta geralmente até a progressão tardia da doença (SINGHAL, SRIVASTAVA, 2012; PROCACCINI *et al.*, 2015).

Além disso, o modelo da EAE ainda fornece poucas informações sobre a progressão da EM. Ainda necessita de estudos e modelos que permitem melhor o estudo das taxas de recaídas observados na EM, métodos capazes de entender melhor a remielinização, no qual é difícil de ser estudada na EAE pelo fato das lesões ocorrerem em relação ao tempo e à localização, além de ser necessário compreender melhor os mecanismos responsáveis por gerar dano à mielina nos tecidos. Sendo também importante o direcionamento de análises envolvendo os danos causados em regiões

específicas do SNC, como o córtex cerebral e cerebelar na EAE, além de mais estudos abordando o papel das células T CD8 que atuam principalmente nas lesões formadas durante a EM (PROCACCINI *et al.*, 2015).

No entanto, existem também diferenças entre MS e EAE, e estes foram salientados pelo fato de que certas terapias tiveram resultados opostos nestes dois modelos. Por exemplo, a administração de interferão (IFN- γ) ou fator de necrose antitumoral (TNF) foi protetora na EAE, mas exacerbou o desenvolvimento na EM (FLETCHER *et al.*, 2010).

Porém diversos resultados do ramo terapêutico no qual tem empenhado em buscar por novos alvos terapêuticos, proporcionaram até agora a descoberta de três terapias estabelecidas para a EM, no qual foram desenvolvidos primeiramente no modelo de EAE: o Acetato de glatiramer, Mitoxantrona e Natalizumab (MIX *et al.*, 2010). Apesar de várias terapias estarem em estudos, a busca de novas terapias com os estudos na EAE tem como objetivos: 1) obter uma visão mais profunda dos mecanismos de ação, proporcionando assim objetivos específicos para a implementação de novas terapias; (2) melhorar terapias já utilizadas e desenvolver novas terapias mais convenientes para a prática clínica (Baixa frequência de aplicação, aplicação oral); (3) e evitar efeitos secundários adversos (MIX *et al.*, 2010).

Além do mais, os camundongos C57BL/6, é um dos modelos murinos mais utilizados em relação a susceptibilidade da EAE, tem características importantes na avaliação da doença, pois permite uma melhor manutenção de animais transgênicos na deleção de genes, sendo ainda que, possui um lugar fundamental nas investigações nos papéis de citocinas e quimiocinas na neuroinflamação. Sendo assim, amplamente utilizado para avaliar potenciais alvos terapêuticos da EM (BITTNER *et al.*, 2014).

1.4. Processo inflamatório na EM e na EAE

Apesar do mecanismo desencadeador da resposta autoimune na EM ainda não ser bem definido, estudos apontam que a propagação e a circulação de segmentos imunorreativos de uma proteína, denominado epítomos, como no caso da mielina, desencadeado seja por um processo inflamatório, por necrose ou morte celular

inflamatória gerada no órgão, ou pelo número crescente de células do tecido, leva a um número crescente de antígenos celulares, permitindo assim captura, processamento e apresentação por um tipo de célula apresentadora de antígeno (APC – *antigen presenting cell*), denominado células dendríticas (DC – *dendritic cell*). Assim, aumentaria o número de auto antígenos apresentados neste estado inflamatório progressivo e a tolerância a este auto antígeno seria perdida (MBONGUE *et al.*, 2014; GRIGORIADISA, PESCHB, VAN, 2015).

No entanto essa perda da tolerância, tem sido corroborada mediante a uma desregulação imune das DCs, que apresentam abnormalidades quanto ao número, recrutamento e função, desencadeando um fenótipo ativado em indivíduos com EM (GRIGORIADISA, PESCHB, VAN, 2015; QUINTANA, YESTE, MASCANFRONI, 2015). Em pacientes com EM, foi observado um grande acúmulo de cDC (célula dendrítica convencional) e pDC (célula dendrítica plasmocitóide) no líquido cefalorraquidiano e na substância branca do cérebro, bem como os níveis de citocinas (Interleucina-12 e Interleucina-23 / IL - interleukin) e quimiocinas (CCL3 e CCL5 / *chemokine C-C motif ligand*) expressos por cDC em lesões acometidas no SNC (LANDER *et al.*, 2008; LONGHINI *et al.*, 2011; VAKNIN-DEMBINSKY *et al.*, 2008; QUINTANA, YESTE, MASCANFRONI, 2015).

Após a ativação das DCs, elas migram através da BHE e induzem a diferenciação das células T de memória em linfócitos pró-inflamatórios T- auxiliares 1 (Th1 / T *helper* 1) e Th17. Por sua vez, a indução de macrófagos e a ativação microglial produz citocinas pró-inflamatórias, radicais de oxigênio e óxido nítrico, responsáveis pela desmielinização e perda axonal. Outros mediadores conhecidos da patologia da EM incluem células T CD8+ e células B de memória dentro do SNC. Algumas marcas patológicas da EM são degeneração axonal precoce e declínio progressivo do volume cerebral em pacientes com síndromes clinicamente isolados que progridem para EM clinicamente definida (GRIGORIADISA, PESCHB, VAN, 2015; XIE *et al.*, 2015).

No modelo de EAE, após a imunização dos camundongos com mielina, as células apresentadoras de antígenos (APCs) após encontrar o antígeno da mielina na periferia, migram para os linfonodos onde apresentam o antígeno às células T naïve. A ativação e

sobrevivência das células T requer dois sinais das APCs: apresentação de antígeno pelo complexo de histocompatibilidade principal (MHC II) para o receptor de células T e um sinal secundário proporcionado pela interação de moléculas co-estimuladoras tais como CD80 (Cluster de diferenciação 80 / Cluster of differentiation) e CD86 com CD28 em células T (GOVERMAN, 2009; SHEMER, JUNG, 2015).

A composição da anatomia do SNC, limita o acesso das células T pela BHE, que tem o papel de restringir o acesso de compostos químicos/biológicos, de patógenos e de células imunes no cérebro (MAYO, QUINTANA, WEYNER, 2012). A composição da BHE por vênulas parenquimatosas, pela barreira do líquido cefalorraquidiano (LCR) que circunda o plexo coróide (onde o LCR é sintetizado), pelas vênulas meníngeas, células endoteliais e epiteliais tem o papel importante de restringir o acesso ao SNC. No entanto, as células T ativadas e de memória podem realizar a vigilância imune do SNC porque expressam moléculas de adesão, receptores de quimiocinas e integrinas que lhes permitem atravessar essas barreiras. Por isso, após serem ativadas e diferenciadas as células T específicas a mielina, infiltram-se no SNC e são reestimuladas por APCs residentes, através da apresentação de peptídeos de mielina pelo MHC II. A reestimulação das células T desencadeia assim a produção de citocinas e quimiocinas, dentre outros mediadores solúveis por muitos tipos de células que potencializa ainda mais o recrutamento de mais células inflamatórias, levando assim a um processo inflamatório, desencadeando desmielinização e dano axonal. (RANSOHOFF, KIVISAKK, KIDD, 2003; GOVERMAN, 2009).

Na EAE, essa resposta imunológica é geralmente iniciada dentro de duas semanas após a imunização na periferia, provocando uma típica paralisia ascendente (paralisia da cauda e posteriormente a paralisia dos membros inferiores e em alguns casos os membros superiores) acompanhada por uma perda progressiva do peso corporal do animal (ENCINAS *et al.*, 2001).

1.5. As células T e o desenvolvimento da doença

A apresentação de antígenos peptídicos pelas APCs por MHCII é crucial para a ativação e regulação das células T. Após serem ativas, as células T são capazes de se diferenciar em subtipos distintos, dependendo da sinalização específica de citocinas, da expressão de receptores de quimiocinas, fatores de transcrição e modificações epigenéticas. Cada subconjunto tem um perfil de citocina diferente, no qual exerce um papel individualizado na diferenciação e função celular (DUFFY, LEES, MOALEN-TAYLOR, 2014).

Estudos prévios mostraram que em lesões iniciais na EM, observa-se que os macrófagos dominavam o infiltrado, seguido por células T CD8, além de observar a presença de células T CD4, células B e células plasmáticas. Onde a presença dessas células, são cruciais para manifestar dano ao cérebro e à medula espinhal (CHARD et al., 2002).

No entanto, estudos recentes evidenciam que as linhagens de células T CD4 são quem controlam o equilíbrio entre o desencadear ou não da inflamação autoimune no SNC. Entre as principais linhagens de células T CD4, destaca-se o papel dos linfócitos Th1 e Th17 que produzem citocinas pró-inflamatórias que, quando produzidas em resposta ao auto antígeno do SNC, promovem o desencadeamento na fisiopatologia da doença (DITTEL, 2008; ROSTAMI, CIRIC, 2013). A presença destas células pró-inflamatórias dentro do cérebro e das placas ativas em indivíduos com EM proporciona evidência anatômica patológica. Numerosos achados, tem apontado que as células Th17, mediada pela presença da interleucina IL-23, desempenham um papel essencial na inflamação do SNC, talvez principalmente nas fases iniciais da doença. Onde células Th1, induzida pela interleucina IL-12 provavelmente contribuem para a patogênese, com seu papel possivelmente mais pronunciada mais tarde na doença (ROSTAMI, CIRIC, 2013) (Figura 2).

Isto é apontado pelo fato de que as células Th1 e Th17, induzirem formas clinicamente indistinguíveis de EAE, mostrando que a composição das células que infiltram no SNC é distinta. Um estudo mostrou que camundongos que receberam células Th1 ativas contra mielina, apresentaram exclusivamente monócitos e linfócitos como células infiltrantes no SNC, enquanto que camundongos que receberam células Th17

apresentaram uma proporção significativa de neutrófilos (KROENKE *et al.*, 2008). No entanto, já em pacientes com EM estudos mostram através de avaliação por ressonância magnética cerebral, que respostas de IFN- γ e IL-17 misturadas têm uma carga de lesões T1 relativamente elevada, e uma presença de danos axônicos permanentes (CARBAJAL *et al.*, 2015).

Com base no perfil de secreção de citocinas nos principais subtipos celulares da doença, foram descritos três principais subconjuntos de linfócitos Th: Th1 (produtores de interferão-gama (IFN γ) e produtores de fator de necrose tumoral (TNF); Th2 (produtores de IL-4, IL-5, IL-13) e Th17 (produtores de IL-17, IL-21 e IL-22) (KNOSP, JOHNSTON, 2012; DUFFY, LEES, MOALEN-TAYLOR, 2014) (Figura 2).

As células Th1 ativas, produzem citocinas pró-inflamatórias tais como IFN- γ e TNF, sendo implicadas tanto na EAE, como na EM (DUFFY, LEES, MOALEN-TAYLOR, 2014).

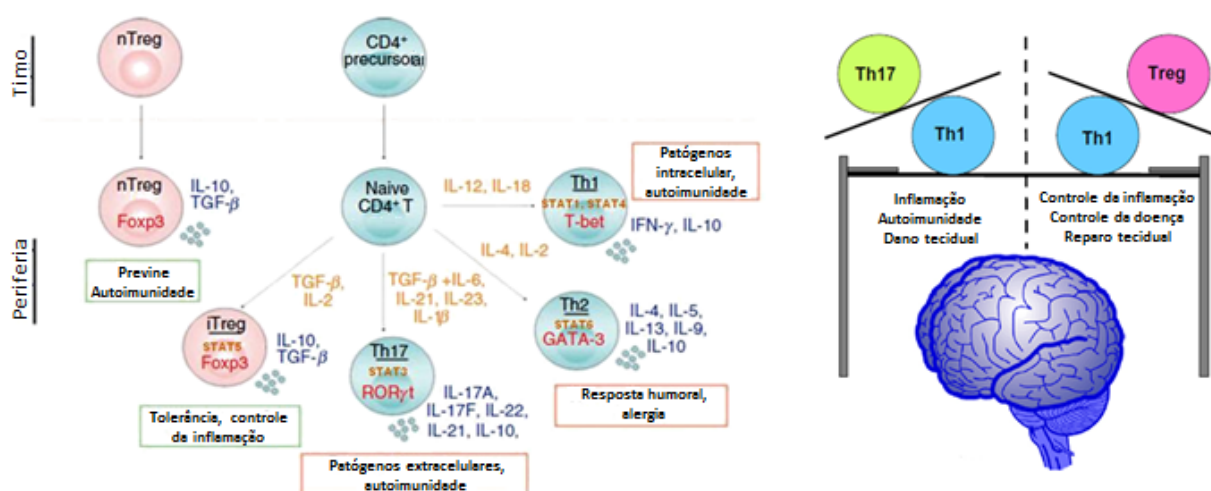


Figura 2. Sinalização, ativação de células T e o desenvolvimento da autoimunidade no SNC. (Adaptado de KNOSP, JOHNSTON, 2012; DITTEL, 2008).

Apesar do papel das células Th1 e Th17 estarem bem estabelecidos na doença, estudos ainda mostram que as células T CD8 tem um papel fundamental nas lesões

formadas durante o processo de desmielinização, onde a produção de mediadores solúveis, de grânulos citotóxicos direcionados para oligodendrócitos e axônios foram observados em tecidos de EM, mostrando similaridades no modelo animal onde apresentou distribuição de lesões semelhantes através dessas células (FRIESE, FUGGER, 2005; GOVERMAN, PERCHELLET, HUSEBY, 2005; SALOU *et al.*, 2015).

As células T reguladoras (Treg) são definidas como células T CD4⁺ responsáveis pela supressão de atividades potencialmente deletérias das células Th. Elas apresentam diversas funções incluindo: prevenção de doenças autoimunes através da manutenção da auto tolerância; supressão de alergia, asma e imunopatologia induzida por patógenos; tolerância feto-materna e tolerância oral. As atividades supressoras atribuídas às células Treg podem ser exercidas em subconjuntos de células Th convencionais, tais como células Th1, Th2, Th17 e T foliculares (Thf) (CORTHAY, 2009)

Em indivíduos saudáveis, as células T Treg podem controlar as células T auto reativas potencialmente patogênicas, enquanto que as células Treg em doentes com EM apresentam capacidades reguladoras insuficientes. No entanto é possível encontrar células T auto reativas no sangue periférico de indivíduos saudáveis sem causar qualquer doença autoimune, isso é devido a importância de um controle eficiente das células Treg, que são responsáveis pela regulação da homeostase imune e auto tolerância (GAWLIK, HAFLER, 2013).

Estudos envolvendo o papel direto das Tregs na EAE, mostram que a recuperação dos sinais clínicos nos camundongos, correlaciona-se com o acúmulo de células T CD4⁺ CD25⁺ produtoras de IL-10 no SNC, sendo capaz de expressar diversos marcadores associados a células reguladoras além de FoxP3, bem como (CTLA-4 / cytotoxic T lymphocyte associated protein 4; GITR / glucocorticoid-induced tumour-necrosis-factor-receptor-related protein e α E β 7 / integrina). Mostrando que a depleção das células Tregs inibe a recuperação natural de camundongos C57BL6 induzidos com EAE. Além de mostrarem que a transferência passiva de células Tregs proporciona proteção contra EAE (MCGEACHY, STEPHENS, ANDERTON, 2005), além de controlar a motilidade de células T e inflamação no SNC (KOUTROLOS *et al.*, 2014).

Avaliações na EM mostram que a atividade supressora de células Treg humanas diminui com a idade, assim como observado em células Treg em camundongos (VENKEN *et al.*, 2006). Por outro lado, dados também revelam um número reduzido de células Treg no sangue periférico e menor expressão de proteína FoxP3 em pacientes com RR do que em pacientes SP e indivíduos controle, sendo correlacionados com a capacidade supressora de Tregs nestes pacientes. No entanto observou-se que os pacientes com RR apresentavam maior número de Tregs no fluido cerebrospinal, onde expressavam mais moléculas de adesão em resposta a tecidos inflamados como CD103 e CD49d, mostrando assim que essas células se acumulam no SNC afim de regular a inflamação. (VENKEN *et al.*, 2008).

Diante disso observa-se que a extensão da inflamação deve ser extremamente controlada ou o acarretará em danos graves ao SNC. Por isso o equilíbrio do sistema imunológico deve sempre se manter. Uma resposta imune fraca ou lenta a um patógeno pode levar à doença e até mesmo à morte, enquanto uma resposta imunológica demasiado robusta ou descontrolada pode levar a danos severos nos tecidos, e para doenças auto-imunes, em última análise a morte (DITTEL, 2008).

1.6. Supressor da sinalização de citocinas (SOCS)

As citocinas são proteínas secretadas que regulam respostas celulares importantes, onde os primeiros estudos observavam seu papel na proliferação e diferenciação celular (STAR *et al.*, 1997). No entanto, hoje se sabe que as citocinas afetam quase todos os processos biológicos, desde o desenvolvimento embrionário, como na patogênese de doenças, em resposta não específica à infecção, em resposta específica a um determinado antígeno, em alterações nas funções cognitivas e progressão dos processos degenerativos do envelhecimento (DINARELLO, 2007).

Até 1997 os eventos chave na transdução de sinal de citocinas já estavam bem definidos: onde se tinha o conhecimento de que a sinalização das citocinas induz a agregação do receptor, levando à ativação de membros da família de tirosinas quinases citoplasmáticas (JAK / *Janus kinase*). Por sua vez, fatores de transcrição da família de sinais transdutores e ativadores de transcrição (STAT / *signal transducers and activators*

of transcription) são fosforilados, se dimerizam e aumentam a transcrição de genes com locais de reconhecimento STAT nos seus promotores. O que ainda não se sabia era como a transdução da sinalização de citocinas era desligada. E foi através de Star *et al.*, que em 1997, descobriu três formas homólogas de proteína contendo domínio SH2 induzida por citocina (CIS - Cytokine Inducible SH2 containing protein), sendo elas denominadas como proteína supressora da sinalização de citocinas (SOCS / supressor of cytokine signalling), como SOCS 1, SOCS 2 e SOCS 3. Starr observou que a expressão de SOCS-1 inibia tanto a fosforilação do receptor induzido pela interleucina-6 como a ativação de STAT e que a transcrição dos outros três genes (SOCS 2, 3 e CIS) eram aumentadas rapidamente em resposta à IL-6, *in vitro* e *in vivo*, sugerindo que essas proteínas podiam atuar num circuito de retroalimentação negativa clássico, para regular a transdução de sinal de citocinas.

Sendo assim as proteínas foram primeiramente descritas como moduladores da sinalização de citocinas e de fatores de crescimento, onde a desregulação desses fatores vem sendo associada a uma variedade de doenças inflamatórias e neoplásicas (LETELLIER, HAAN, 2016).

A família SOCS, é constituída por oito membros (SOCS-1 a SOCS-7 e CIS), sendo que todos eles compreendem um domínio N-terminal com comprimento variável de sequências de aminoácidos, um domínio Src central de homologia 2 (SH2) e uma caixa SOCS C-terminal altamente conservada (FIGURA 2) (LARSEN, ROPKE, 2002).

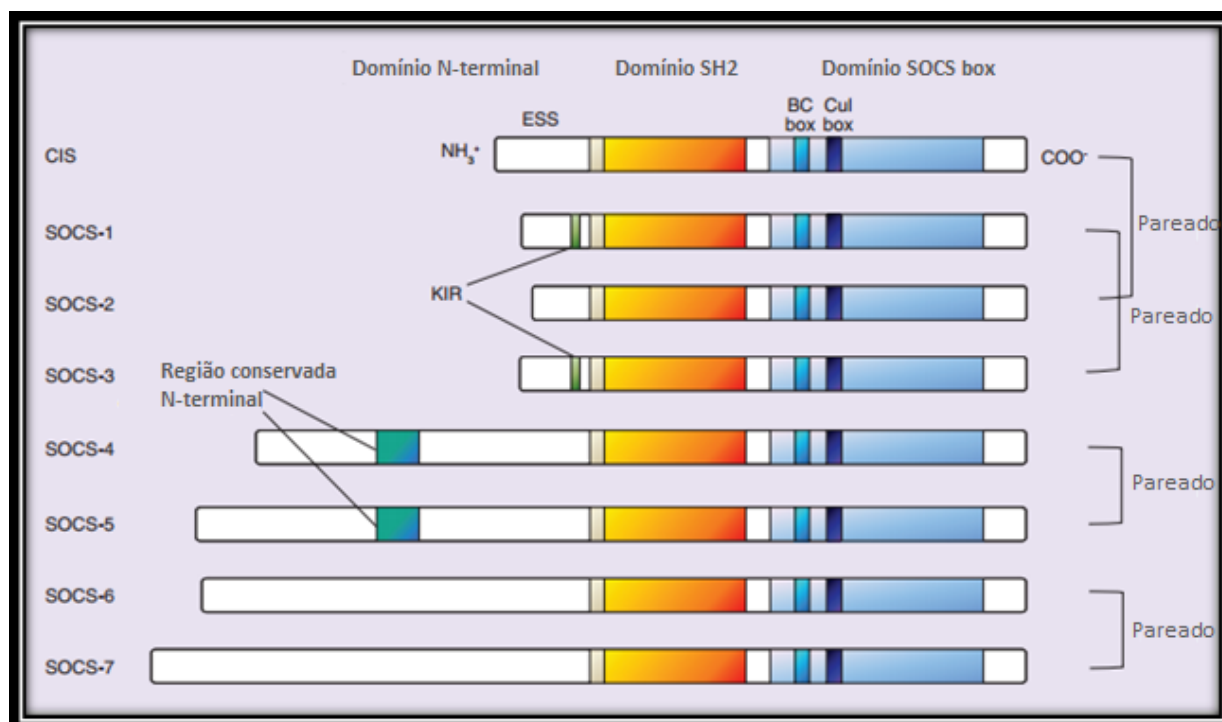


Figura 3. Estruturas das proteínas SOCS (Extraído de FENG et al., 2016).

Dentro da cascata de sinalização de proteínas SOCS (Figura 4), observa-se que a ligação de citocinas ao receptor na superfície celular promove a associação das subunidades do receptor e sinaliza uma cascata de eventos de fosforilação a jusante. Esta via de sinalização começa com a fosforilação cruzada e a ativação das JAKs associadas ao receptor, levando assim a fosforilação de locais nas caudas citoplasmáticas dos receptores ativados, criando assim locais de ancoragem para as proteínas STAT. O recrutamento destes fatores de transcrição é seguido pela fosforilação e dimerização das STATs. Os dímeros STAT ativados translocam-se para o núcleo onde podem iniciar a transcrição de uma variedade de genes com diversas funções, seja responsável pela sobrevivência e proliferação, dentre outras. No entanto a ativação de STAT também promove a transcrição SOCS que podem suprimir mais sinalização e assim restaurar a sensibilidade da célula a futuros estímulos por citocinas (FIGURA 3) (UREN, TURNLEY, 2014).

Após transcritos, as proteínas SOCS demonstraram ter três mecanismos de modulação diferentes: através do domínio SH2 eles se ligam a fosfotirosinas na proteína alvo, conduzindo à inibição da transdução de sinal por inativação N-terminal de JAK, bloqueando o acesso de STAT aos locais receptores, ou por proteínas ligadas ao encaminhamento de caixas SOCS, atuando como componente de recrutamento de substrato de complexos E3-ubiquitina ligase para degradação proteasomal (LARSEN, ROPKE, 2002; UREN, TURNLEY, 2014; LETELLIER, HAAN, 2016).

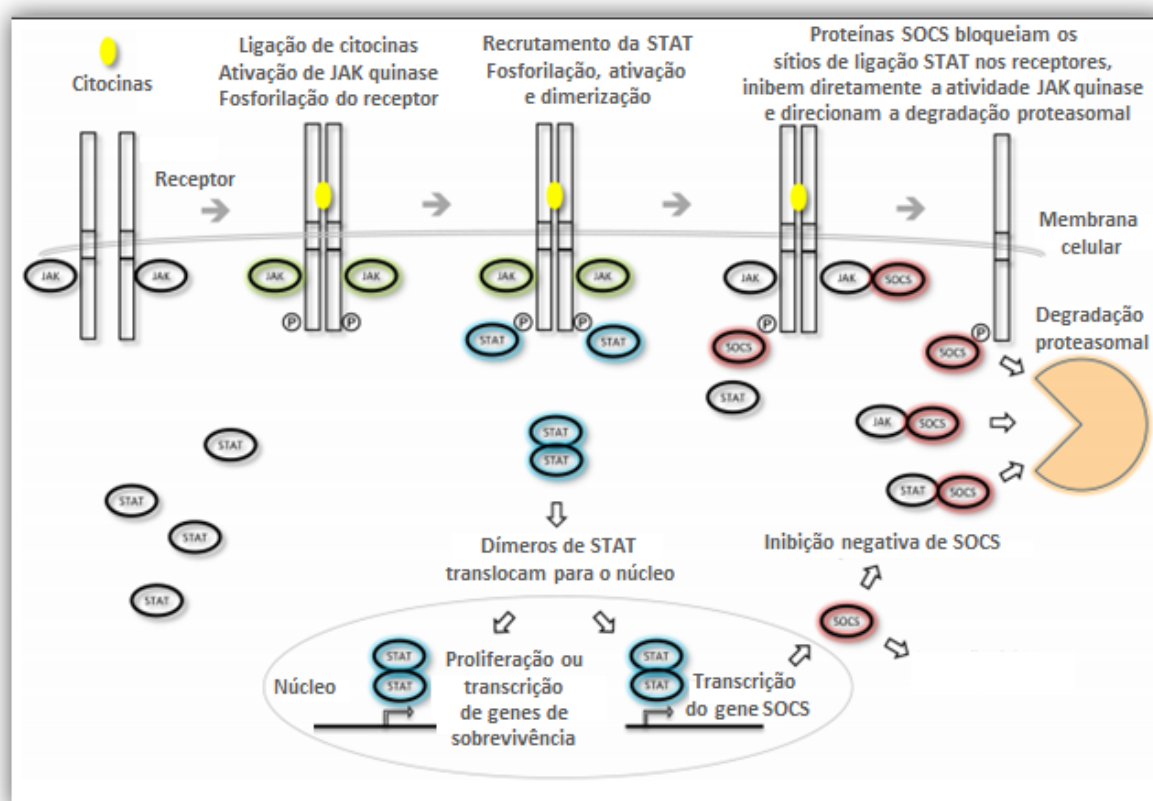


Figura 4. Mecanismos de inibição da sinalização de citocinas por proteínas SOCS (Adaptado de UREN, TURNLEY, 2014).

1.7. Mecanismos e funções de SOCS2

Estudos mostram que a expressão de SOCS2 é ativada por diversos de fatores que ativam a STAT 5, sendo eles a estimulação de receptores do tipo Toll (TLR – toll-like receptores) (POSSELT *et al.*, 2011), hormônios (hormônio do crescimento, prolactina, insulina, estrógeno), algumas citocinas (IL-1, IL-2, IL-3, IL-10, IL-6, IFN- α , IFN- γ , CTNF, dentre outras), e outros mediadores como 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin-TCDD) e lipoxinas (RICO-BAUTISTA, 2006).

Diversos estudos, tem demonstrado o papel importante de SOCS2 em diversos processos biológicos, bem como em diversas doenças e modelos utilizados. Uma das primeiras informações conhecidas por SOCS2 além de ser um supressor na sinalização de citocinas, foi observar a sua atividade no SNC. Identificou que SOCS2 apresentava uma expressão elevada desde o 14º dia embrionário até o 8º dia pós-natal e decrescendo sua expressão posteriormente. No qual a sua expressão foi observada exclusivamente em neurônios, sendo ativada na fase de desenvolvimento no momento da diferenciação neuronal (POLIZOTTO, BARLETT, TURNLEY, 2000). Estudos posteriores também mostraram que SOCS2 tem um papel importante em bloquear os efeitos inibitórios do hormônio de crescimento (GH) na diferenciação neuronal e promover a neurogênese (RANSOME, TURNLEY, 2005). Além do mais, estudos posteriores mostraram que SOCS2 tem um papel importante na regulação do hormônio do crescimento (GH – growth hormony) e do fator de crescimento semelhante a insulina 1 (IGF1), onde camundongos SOCS2^{-/-}, apresentaram características do fenótipo de crescimento elevado, demonstrando que a deficiência de Socs2 afeta o crescimento pré-natal e pós-natal, através da desregulação do GH/IGF1 (HORVAT, MEDRANO, 2001).

Além de SOCS2 ser um regulador importante de GH, IGF1 e prolactina, estudos mostram que SOCS2 também apresenta um papel crucial no desenvolvimento de alguns tipos de câncer, como o de próstata. Ensaios *in vitro* e *in vivo* revelaram o envolvimento do SOCS2 na regulação do crescimento celular e apoptose, onde a ausência da expressão de SOCS2 inibiu a proliferação de células do câncer de próstata (CP). Esta diminuição do crescimento celular após a desregulação SOCS2 foi associada à parada do ciclo celular e à apoptose de células do CP (HOEFER *et al.*, 2014). Outros estudos também mostram que a expressão de SOCS2 é importante para regular o

desenvolvimento do carcinoma colorretal e hepatocelular, onde observa-se regulação baixa na expressão de SOCS2, seguida de metilações em regiões promotoras do gene (LETELLIER *et al.*, 2014; CUI *et al.*, 2016).

Durante a infecção por *Toxoplasma gondii*, observou-se que SOCS2 teve um papel importante para regular negativamente a expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-12, IFN- γ e TNF, além de regular o infiltrado de leucócitos no cérebro e no fígado, bem como a expansão de células T produtoras de IFN- γ , sendo mediada pela ativação de lipoxina-A4 (MACHADO *et al.*, 2006). Já durante a infecção por *Trypanosoma cruzi*, camundongos SOCS2^{-/-}, apresentaram uma redução tanto da parasitemia como da expressão de várias citocinas como IFN- γ , TNF, IL-6, IL-10, SOCS1 e SOCS3 no baço e de IFN- γ , TNF, SOCS1 e SOCS3 em corações de camundongos SOCS2^{-/-} infectados. Apesar de observar um aumento na geração e expansão de células T reguladoras (Treg) e dos níveis de LXA4, observou-se através de análises ecocardiográficas que camundongos SOCS2^{-/-} infectados apresentavam um maior comprometimento da função cardíaca (ESPER *et al.*, 2012).

Estudos recentes mostraram que SOCS2 apresenta um papel fundamental na estabilidade de células Treg. Análises identificaram que SOCS2 é preferencialmente expresso tanto em células Tregs naturais como em Tregs induzíveis (iTregs). Observaram que células TCD4⁺ FoxP3 deficientes de SOCS2 não conseguiam manter estável a expressão de FoxP3, sendo ainda que após a estimulação com IL-4 nestas células, observou a secreção de níveis elevados de citocinas como de IFN- γ e IL13 nas células deficientes de SOCS2, mostrando que SOCS2 é essencial para manter o fenótipo anti-inflamatório de iTregs, impedindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias (KNOSP *et al.*, 2013).

Estudos envolvendo doenças autoimune como Lúpus eritematoso sistêmico (LES), bem como pacientes com artrite reumatóide (AR) mostraram que pacientes com as doenças apresentavam níveis de SOCS2 semelhantes em células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) em comparação com indivíduos normais (TSAO, KUO, LIN, 2008). Porém estudos avaliando as células T do sangue periférico apresentaram um aumento nos níveis de SOCS2 em pacientes com AR (ISOMÄKE *et al.*, 2007). No entanto,

após bloquearem TNF em pacientes com AR, observou redução dos níveis de SOCS2, mostrando que TNF pode desempenhar um papel na regulação da expressão do gene SOCS2 em PBMCs, sugerindo que SOCS2 desempenha um papel importante na regulação durante o processo inflamatório (TSAO, KUO, LIN, 2008).

Já envolvendo o papel de SOCS2 na EM, alguns achados mostraram uma baixa expressão de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) de SOCS2 em PBMCs, em pacientes RR que não haviam recebido nenhum tratamento contra a doença. Indicando uma correlação entre a expressão reduzida de SOCS2 e outros dois fatores (NR4A2 e TNFAIP3) em uma pior inflamação e um pior curso de doença, sendo os níveis basais mais baixos nos doentes com um curso de doença mais maligna do que nos doentes com um curso de doença mais benigna, correlacionados a pacientes RR através da utilização da). Porém pacientes que foram tratados com acetato de glatiramer e interferon beta apresentaram um aumento dos níveis de expressão de SOCS2 quando comparado com pacientes não tratados. Isto mostra que o curso da doença não é estabelecido meramente a partir de uma reação pró-inflamatória hiperativa, mas a desregulação de "sinais de parada" (breaking signals) na inflamação (GILLI *et al.*, 2011).

Diante da grande diversidade de funções e mecanismos envolvidos pela atividade de SOCS2, demonstrando que SOCS2 não é apenas um supressor mas também um regulador de diversos mecanismos, decidimos elucidar mais a fundo o papel de SOCS2 na autoimunidade e investigar a importância de SOCS2 no SNC durante o desenvolvimento da EAE, afim de avaliar a sua importância no estabelecimento dos sinais clínicos da doença, bem como sua atividade durante o processo inflamatório na fase aguda e de remissão da doença em modelo animal.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo estudar o envolvimento da proteína SOCS2 durante a encefalomielite autoimune experimental.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Investigar a expressão de SOCS2 durante o desenvolvimento da doença e em células da glia isoladas em cultura
- ✓ Avaliar a presença de MOG nas células da glia, investigando a expressão de SOCS2.
- ✓ Analisar clinicamente e anatomicamente através de histologia os sinais clínicos da doença através da ausência de SOCS2 nos camundongos nocautes.
- ✓ Elucidar a expressão de IRF-1 no SNC durante o desenvolvimento da doença.
- ✓ Examinar o infiltrado no SNC e a expansão no baço de subtipos de células TCD4 e TCD8, que são importantes para o estabelecimento e desenvolvimento da doença.
- ✓ Examinar a presença de células Treg e T CD4 produtoras de IL-10 no infiltrado do SNC e concomitantemente a expansão delas no baço, sendo fundamentais na regulação da resposta inflamatória durante o desenvolvimento da doença.
- ✓ Investigar através de quimeras o importante papel das células periféricas e residentes expressando ou não SOCS2 durante o curso da doença.

3. Material e métodos

3.1. Animais

A realização dos experimentos contou com a utilização de camundongos fêmeas C57BL/6 e SOCS2^{-/-} com idade entre 8 a 12 semanas. Os camundongos C57BL/6 foram criados e obtidos pelo Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO-ICB-UFMG) e os animais SOCS2^{-/-} foram criados e obtidos pelo biotério de criação próprio localizado no bloco C2 do (ICB-UFMG). Os camundongos foram criados e utilizados segundo a Diretriz Brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos – DBCA (CONCEA, 2016). Este projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais (CEUA) da UFMG, sob o número de protocolo 253/2016.

3.2. Indução e avaliação dos sinais clínicos da EAE

A indução da EAE foi realizada através do preparo da emulsão contendo 100 µg de MOG₃₅₋₅₅ (*Sigma Aldrich M4939*) por animal, com adição de adjuvante completo de Freund (*Complete Freund's Adjuvant- DIFCO F5881*) em uma proporção de 1/1 do volume de MOG₃₅₋₅₅ utilizado acima e uma adição de *Mycobacterium tuberculosis* H37 RA (Difco Laboratories, Sparks, MD, USA) afim de resultar em 4 mg/mL de CFA. Cada animal recebeu 100ul dessa emulsão subcutaneamente. Em seguida foram injetadas, 300 ng/animal de toxina Pertussis (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) no dia da imunização e após 48 horas. Diariamente os animais foram avaliados usando um protocolo de escore clínico que avalia os sinais clínicos que varia de 0 a 4,5 como mostrado na tabela abaixo:

Tabela 1. Escore Clínico

0	Ausência de sinais clínicos
0,5	Paralisia parcial da cauda
1	Paralisia da cauda ou andar deficiente

1,5	Paralisia parcial da cauda e andar deficiente
2	Paralisia da cauda e andar deficiente
2,5	Paralisia parcial das patas traseiras
3	Paralisia de uma pata traseira
3,5	Paralisia de uma pata traseira e parcial da outra
4	Paralisia completa das patas traseiras
4,5	Paralisia completa das patas traseiras e fraqueza na pata (s) dianteira (s)

A perda de peso dos animais também foi acompanhada pesando os animais nos dias 0, 3, 7 e posteriormente foram pesados diariamente.

3.3. Histologia

Foi realizado estudos histopatológicos afim de avaliar alterações morfológicas e estruturais do tecido cerebral e medular durante o desenvolvimento da doença. Os camundongos foram sacrificados no 14º e 28º dpi, com uma dose excessiva de anestésico (10 mg/mL de Xilazina e e 150 mg/mL de Cetamina, Rompun® - Bayer, Laboratório Cristália, SP). Após a necropsia, os tecidos foram coletados e colocados em imersão em solução de formol tamponado a 10%. Após o período de fixação (no mínimo 12 horas), os tecidos foram recortados utilizando uma navalha e seccionados transversalmente.

Em seguida o processo de desidratação foi realizado em concentrações crescentes de álcool (70%, 80%, 90% e absoluto I, II e III) com a finalidade de remover a água presente nos mesmos, sendo que os fragmentos permaneceram imersos por um período de 30 minutos em cada álcool. A diafanização foi realizada após a etapa de desidratação, com o intuito de obter transparência da estrutura do tecido junto com a preservação do mesmo, consistindo assim em colocar os fragmentos a dois banhos de Xilol (98,5%) com duração de 20 minutos cada. Por fim os tecidos foram impregnados e incluídos em parafina.

Foi utilizado para secção dos fragmentos dos órgãos em blocos de parafina um micrótomo (American Optical, microtome 028 rotary), obtendo cortes seriados com 4µm

de espessura. Os cortes obtidos foram corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina (HE). Por fim, as lâminas obtidas foram avaliadas ao microscópico óptico (aumento de 200x) (Olympus, Bx43), para estudos histológicos.

3.4. Western Blotting

O cérebro dos camundongos controle e induzidos com a EAE, foram coletados no 14º e 28º dpi. Para o processamento do extrato celular total utilizou-se o tampão de lise (1% Triton X 100, 100mM Tris/HCl (ácido clorídrico), pH 8.0, 10% Glicerol, 5mM EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético / *Ethylenediamine tetraacetic acid*), 200mM NaCl (cloreto de sódio), 1mM DTT (Ditiotreitol / *dithiothreitol*), 1mM PMSF (Fluoreto de fenilmetilsulfonilo / *phenylmethylsulfonyl fluoride*), 25mM NaF (Fluoreto de sódio / *Sodium Fluoride*), 2.5mg/mL Leupeptina, 5 mg/mL aprotinina, e 1mM ortho-vanadato de sódio). Os cérebros foram processados no Homogeneizador Fisher Scientific e os lisados foram centrifugados a 10000 rpm por 20 minutos a 4°C e quantificados através da solução de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA). Em seguida, os sobrenadantes das culturas foram coletados e estocados a -80°C até posterior utilização. Extratos protéicos contendo (80 a 100 ug) foram separados por eletroforese em um gel desnaturante entre 8 a 15% de poliacrilamida-SDS e transferidos para membranas de nitrocelulose (Millipore). Após as membranas serem bloqueadas por duas horas com solução de PBS contendo 5% de leite e 0,1% de Tween 20, incubou-se com os correspondentes anticorpos de cada experimento. Para a detecção das bandas, utilizou-se o sistema de detecção quimioluminescência (GE Healthcare), como descrito pelo fabricante

3.5. Citometria de fluxo

Em seguida da eutanásia dos camundongos na cinética estabelecida como fase de maior escore e remissão da doença, o cérebro, a medula espinhal e o baço foram retirados dos camundongos, macerados e os leucócitos foram isolados por

homogeneização em meio RPMI através de gradientes contendo 30 e 70% de percoll (Sigma, St. Louis, MO). Após centrifugação (1100xg), a mielina acumulada na superfície do tubo foi retirada e descartada. Os leucócitos foram removidos da interface entre as camadas de 30 e 70% de percoll. Em seguida, os leucócitos foram centrifugados (260xg) e ressuspensos em 1 mL de uma solução contendo 0,5% de albumina sérica bovina (BSA), 2mM de azida e tampão salina fosfato (Ph 7.4). Para a marcação intracelular foi utilizado a solução de Saponina 1%, afim de permitir a permeabilização da membrana citoplasmática. Posteriormente os leucócitos obtidos dos tecidos foram então marcados com uma combinação de: CD3(APCcy7), CD4(PEcy7), CD8(FITC), IFN- γ (APC); IL-17A(APC), e CD25(PerceP), FoxP3(PE), IL-10(APC). As amostras foram lidas e os dados foram adquiridos utilizando-se FACSCanto II (Becton Dickinson, San José, CA, USA) e foram então analisados através do *software* FlowJo (Tree Star, Ashland, Oregon, USA).

3.6. Cultura primária de glia

Foram utilizados para extração e cultivo de células da glia camundongos neonatos da linhagem C57BL/6 e SOCS2^{-/-} de até 3 dias de nascimento conforme protocolo desenvolvido por Chen *et al* 2013. Os neonatos foram eutanasiados por decapitação. Em seguida, o cérebro foi removido e picotado em pequenos pedaços em solução tripsina/EDTA (0.005%). A suspensão foi homogeneizada em um erlenmeyer estéril com bailarina em incubação a 37°C por 10 minutos para desagregação enzimática. Após esse período, DMEM (Meio de Eagle modificado por Dulbecco / *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) com 10% de SFB foi adicionado na proporção de 1:1 para neutralizar a atividade da tripsina. A suspensão então foi centrifugada a 2.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 10mL/garrafa DMEM com 10% de SFB e transferido para as garrafas previamente revestidas com Gelatina a 1% (Gelatin from porcine skin G2500 - Sigma) e mantida em estufa a 37°C em uma atmosfera de 5% CO₂. Após 24 horas, o meio foi substituído por meio novo e a partir de três em três dias, o mesmo foi trocado em sua metade por um meio novo. Após 13 dias após o início da cultura o meio foi completamente substituído por DMEM a 5% de SFB e no dia seguinte

(14 dias), quando as células já apresentavam uma confluência de 90-100%, as células foram extraídas com tripsina/EDTA (0.005%) e foram plaqueadas a 1×10^6 de células por poço. Após a incubação overnight as células receberam estímulos com LPS (lipopolissacarídeo - 1 ug/mL) e MOG (20 ug/mL), durante 6 horas sendo aplicado ATP (adenosina trifosfato - 5 mM), 30 minutos antes do final da cinética. No final da cinética coletou-se o sobrenadante em cada poço e extraiu-se as células com tampão de lise (1% Triton X 100, 100mM Tris/HCl, pH 8.0, 10% Glicerol, 5mM EDTA, 200mM NaCl, 1mM DTT, 1mM PMSF, 25mM NaF, 2.5mg/mL Leupeptina, 5 mg/mL aprotinina, e 1mM ortho-vanadato de sódio) para a realização da técnica de western blotting.

3.7. Quimeras

Os camundongos C57BL/6 e SOCS2^{-/-} foram irradiados duas vezes com uma dose de 3,5 em um intervalo de 2 horas totalizando uma dose de 7 grays. Após a irradiação as células da medula óssea de camundongos C57BL/6 e SOCS2^{-/-} doadores foram isoladas e imediatamente transferidas para os camundongos irradiados. Células de animais WT foram transferidas para nocautes receptivos e vice-versa com as células de animais SOCS2^{-/-}. Foram transferidas o total de 1×10^6 de células por camundongo receptor. Após 24 horas da irradiação foi analisada o esfregaço sanguíneo em lâminas coradas com Panótico (Laborclin) afim de observar a exatidão da irradiação através da ausência de leucócitos no sangue. A cada 7 dias em um período de três semanas após a transferência de células, realizou-se a análise da população de leucócitos através do esfregaço sanguíneo dos animais irradiados, e animais saudáveis não submetidos a irradiação foram utilizados como controle. Após três semanas foi induzida a EAE nos animais quiméricos.

3.8. Co-cultura de cultura primária de Glia com sobrenadante de esplenócitos de camundongos naïve ou induzidos com EAE

Após 14^odpi os esplenócitos foram isolados do baço de camundongos induzidos com EAE, juntamente com os de camundongos C57BL/6 naïve e foram plaqueados a 1×10^6 células por poço com meio DMEM completo em placa de 24 poços e permaneceram incubadas por 24 horas em uma estufa de CO₂ a 37°C. Após 24 horas o sobrenadante de esplenócitos foram retirados e colocados em células de cultura primária de glia (conforme previamente descrito no item 3.6), que estavam plaqueadas a 1×10^6 células por poço com meio DMEM completo em placa de 24 poços. Após 24 horas retirou-se o sobrenadante e extraiu-se as células com tampão de lise (1% Triton X 100, 100mM Tris/HCl, pH 8.0, 10% Glicerol, 5mM EDTA, 200mM NaCl, 1mM DTT, 1mM PMSF, 25mM NaF, 2.5mg/mL Leupeptina, 5 mg/mL aprotinina, e 1mM ortho-vanadato de sódio) para a realização da técnica de western blotting.

3.9. Análises estatísticas

Para realizar as análises estatísticas utilizou-se o programa Prisma 5.0 (GraphPad, La Jolla, CA, USA). Os dados foram relatados de forma descritiva utilizando-se as medidas de tendência central média e desvio padrão e/ou mediana e erro padrão. O nível de significância considerado foi $p < 0.05$ ou, em alguns dados, $p < 0.001$.

4. Resultados

4.1. Expressão de SOCS2 no SNC durante o desenvolvimento da EAE

Após a indução dos camundongos C57BL/6 e SOCS2^{-/-}, observou-se a expressão da proteína SOCS2 no cérebro dos animais durante o desenvolvimento da EAE, quando os animais atingiram o maior nível de score clínico que ocorreu no 14^o dpi.

Através da análise por Western Blotting, observou-se que uma expressão basal da proteína no cérebro de camundongos controles. Já os animais induzidos com EAE demonstraram um aumento nos níveis de SOCS2 no cérebro dos animais, podendo assim

sugerir que SOCS2 tem um papel importante durante o desenvolvimento da doença (Figura 1 A e B).

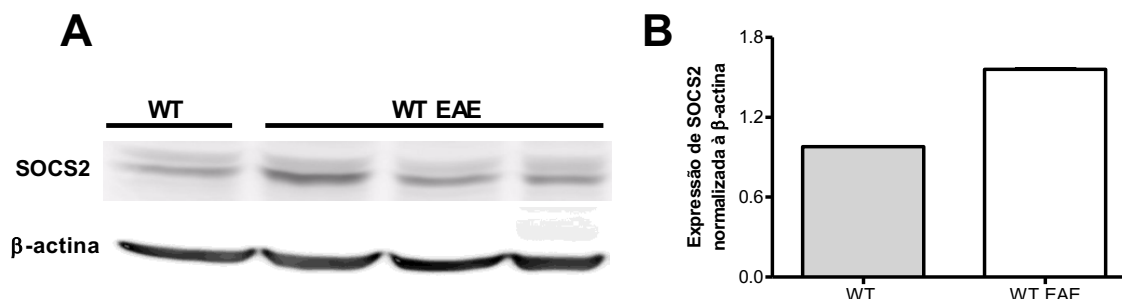


Figura 5. Expressão da proteína SOCS2 no cérebro de camundongos após a indução da EAE. O cérebro de camundongos C57BL/6 (WT) foram coletados e processados para as análises por Western Blotting. **(A)** Expressão da proteína SOCS2. **(B)** Normalização da expressão da proteína SOCS2. A proteína β -actina foi usada como controle para normalização das proteínas alvo. Os dados são representativos de um de três experimentos independentes e apresentados como médias $\pm$ SEM.

6.2 O estímulo com MOG leva a expressão de SOCS2 em células da glia

Após observar a expressão de SOCS2 em cérebros de camundongos C57BL/6 e induzidos com EAE, procuramos investigar se apenas a presença de epítopos de mielina no SNC era capaz de proporcionar a expressão da proteína SOCS2, ou se a potencialização da expressão da proteína SOCS2 é dependente de um estímulo inflamatório.

Então após estimular as células da glia de camundongos neonatos C57BL/6 com estímulos inflamatórios e com epítopos de mielina, observamos que apenas epítopos de mielina em uma cultura de células de glia eram capazes de aumentar a expressão de SOCS2 (Figura 2 A e B).

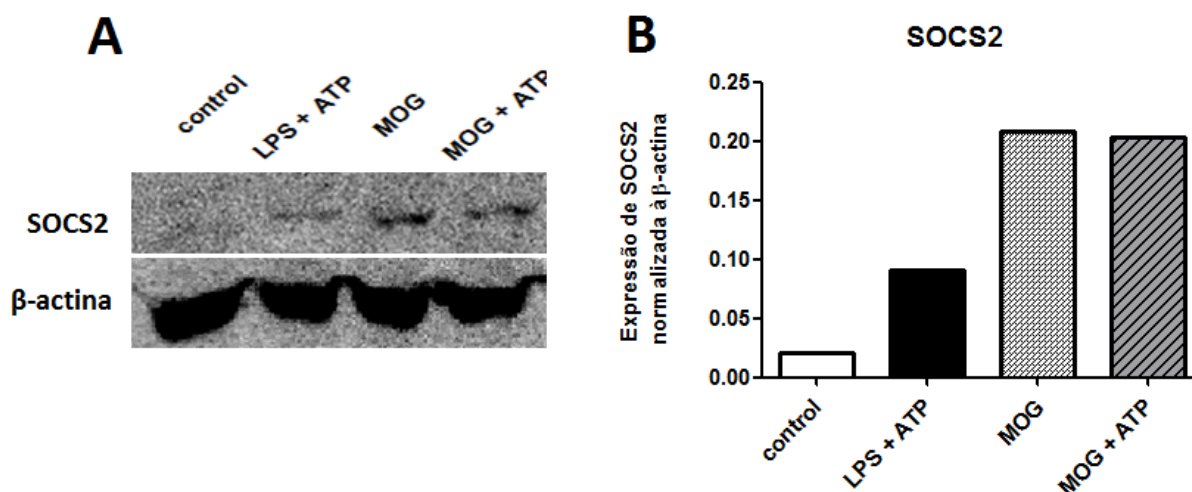


Figura 6. Expressão da proteína SOCS2 em cultura de células da glia após estímulo com epítomos de mielina. O cérebro de camundongos neonatos C57BL/6 foram coletados e processados para o cultivo das células da glia. Após 14 dias de cultivo, as células da glia receberam os seguintes estímulos por um período de 6 horas: 1- Lipopolissacarídeo (LPS) + Adenosil trifosfato (ATP); 2- epítomos de glicoproteína de mielina de oligodendrócito 35-55 (MOG 35-55); 3- MOG + ATP. O ATP foi adicionado 30 minutos antes do final da cinética. **(A)** Expressão da proteína SOCS2. **(B)** Normalização da expressão da proteína SOCS2. A proteína β-actina foi usada como controle para normalização das proteínas alvo. Estes resultados são preliminares e representativos de um experimento e apresentados como médias $\pm$ SEM.

6.3 A ausência de SOCS2 retarda o aparecimento dos sinais clínicos da doença durante o desenvolvimento da EAE

Após a investigação da expressão da proteína SOCS2, monitoramos o escore clínico e a perda de peso nos camundongos C57BL/6 e SOCS2^{-/-} durante o desenvolvimento da doença, afim de observar a importância da proteína no estabelecimento da doença (Figura 3 A e B).

No nosso laboratório, nossos primeiros resultados previamente descritos (CRAMER, Allysson; OLIVEIRA, Bruno – paper em andamento), foram observados que durante as duas primeiras semanas após a imunização, camundongos SOCS2^{-/-} tiveram um retardo no aparecimento dos sinais clínicos da doença, quando comparados com os animais C57BL/6. Observando que no 11º dpi os camundongos C57BL/6 iniciavam os sintomas, alcançando rapidamente a uma severidade da doença até o 14 dpi (Figura 4 A). Quando avaliada o percentual de evolução da massa corporal durante o desenvolvimento da doença, observou-se que a perda da massa corporal era proporcional

à severidade da doença. Os camundongos $SOCS2^{-/-}$ apresentavam uma perda de massa corporal bem reduzida nos primeiros dias da sintomatologia quando comparada aos camundongos C57BL/6, onde apresentaram uma perda de peso acentuada até o 14º dpi (Figura 4 B).

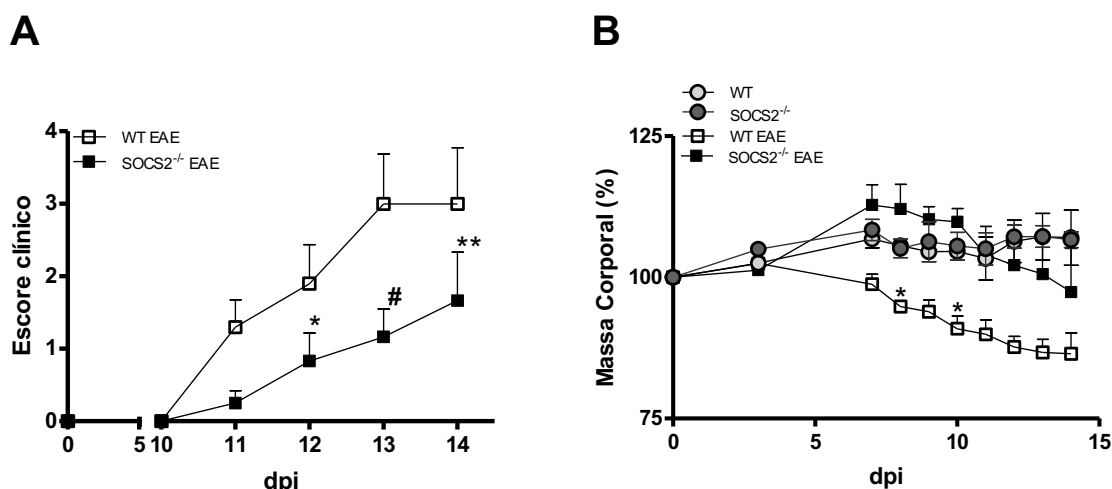


Figura 7. Sintomatologia e o desenvolvimento da EAE em camundongos C57BL/6 e $SOCS2^{-/-}$. Camundongos C57BL/6 (WT) e $SOCS2^{-/-}$ receberam a emulsão subcutânea de MOG em CFA com posterior aplicação de Toxina pertussis para a indução de EAE. Foi realizado o monitoramento do (A) Escore clínico, (B) Massa corporal, durante o desenvolvimento da EAE. Os dados são representativos de um em três experimentos independentes e apresentados como médias $\pm$ SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, # $p < 0.001$.

6.4 A ausência de $SOCS2$ reduz a debilidade locomotora durante a fase de pico da doença

Durante o desenvolvimento da EAE, o escore clínico nos camundongos é observado claramente pela debilidade motora da cauda e dos membros dos camundongos causado pelo intenso processo inflamatório no SNC. Quando observado os sinais clínicos na fase de pico da doença, observou-se que camundongos $SOCS2^{-/-}$ apresentavam menor debilidade locomotora, onde era observado apenas a paralisia da cauda e uma leve perda do controle do equilíbrio, quando comparado aos camundongos C57BL/6, que apresentavam além de paralisia total da cauda, uma intensa prostração seguida de paralisia total das patas traseiras. Além do mais, neste período de pico da

doença, foi possível observar a intensa severidade da doença nos camundongos C57BL/6 em comparação aos camundongos SOCS2^{-/-}, que apresentaram em alguns casos uma incontinência urinária, além de uma leve debilidade motora nas patas dianteiras. Mostrando assim que SOCS2 tem um papel importante no estabelecimento dos sinais clínicos na fase de pico da doença (Figura 4).



Figura 8. A ausência de SOCS2 resulta em menor debilidade motora nos camundongos SOCS2^{-/-} durante a fase de pico da doença. Imagens representativas dos sinais clínicos da doença, em camundongos C57BL/6 (WT) e SOCS2^{-/-} no 14º dpi. Os dados são representativos de um em três experimentos independentes.

6.5. SOCS2 orchestra o infiltrado celular e a inflamação no SNC durante a fase aguda de EAE

Um dos fatores essenciais para desencadear o processo inflamatório no SNC e o aparecimentos dos sinais clínicos na EAE, é a participação do infiltrado celular. Afim de verificar a proporção do infiltrado celular e a inflamação na medula espinhal e no cérebro foi realizado análises histológicas em ambos os camundongos C57BL/6 e SOCS2^{-/-} quando o escore clínico nos animais C57BL/6 atingiram o maior índice de score, que ocorreu no 14º dpi. Em nossas análises histológicas obtidas previamente (CRAMER, Allysson; OLIVEIRA, Bruno – paper em andamento) camundongos SOCS2^{-/-} apresentaram menor lesão cerebral devido a um menor infiltrado de células mononucleares no tronco cerebral, sob o hipocampo, quando comparada aos animais

C57BL/6 que demonstraram um maior infiltrado de células, consequentemente levando a uma maior inflamação no SNC (Figura 4). Corroborando assim com os dados do escore clínico dos dois grupos de animais, onde o menor infiltrado de células nos camundongos SOCS2^{-/-} produz uma menor inflamação e dano no SNC, tendo como consequência uma menor debilidade motora e um baixo escore clínico, quando se comparado aos camundongos C57BL/6, como demonstrado na figura 3 A.

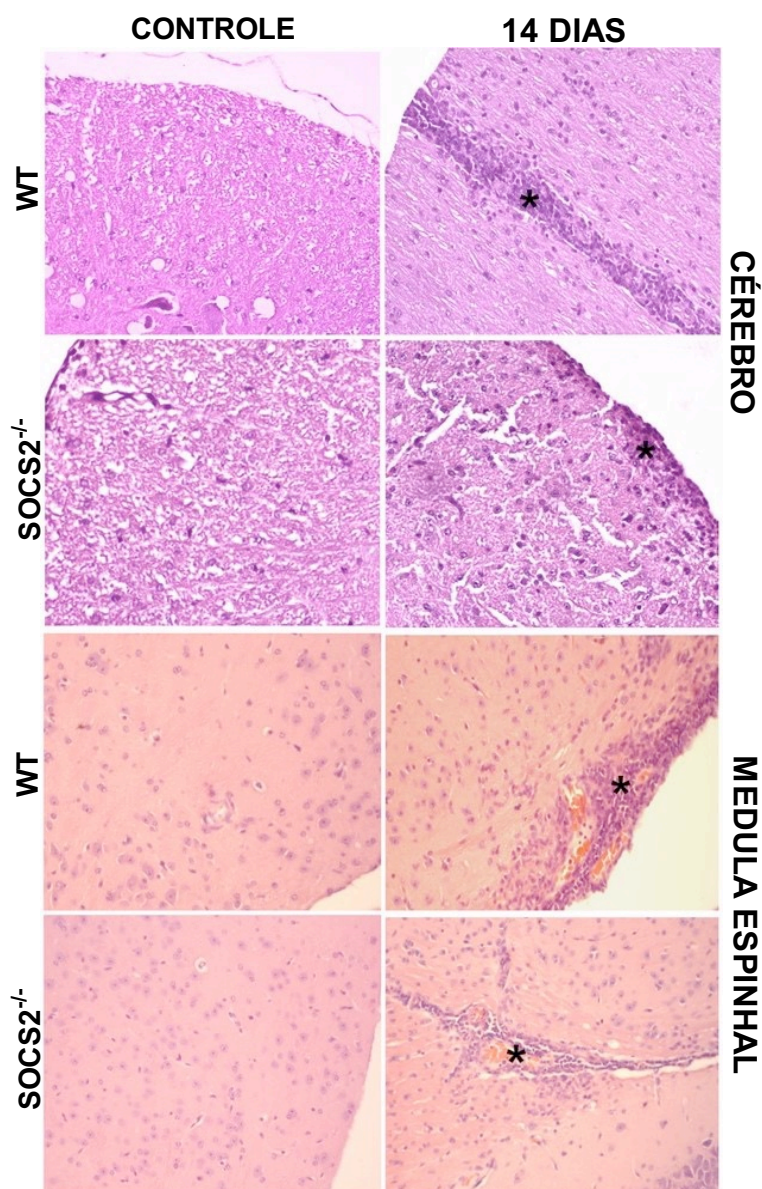


Figura 9. Camundongos SOCS2^{-/-} apresentam menor infiltrado celular e redução da inflamação no SNC durante a fase de pico da EAE. Foi realizado a análises histológicas de secções de cérebro (região do tronco cerebral) e medula espinhal de camundongos C57BL/6 (WT) e SOCS2^{-/-}. Mostrando que no cérebro: camundongos C57BL/6 induzidos com EAE mostraram um infiltrado intenso e extenso de células mononucleares (*). Camundongos SOCS2^{-/-} induzidos com EAE apresentaram inflamação perivascular moderada (*). E na medula espinhal: camundongos C57BL/6 induzidos com EAE mostraram intenso mielite com infiltrado de células mononucleares (*). Camundongos SOCS2^{-/-} induzidos com EAE com mielite moderada (*). Ampliação original: 100x. Os dados são representativos de um em dois experimentos independentes.

Estes dados sugerem então a correlação entre a severidade reduzida nesses animais e o baixo nível de inflamação na medula espinhal. Diante disso, AhR bem como SOCS2 se mostram como moléculas de grande importância para o desenvolvimento de EAE nos animais, sendo que ambas estão relacionadas a papel prejudicial na fase inicial da doença.

6.6. Fatores liberados pelas células T de esplenócitos são capazes de aumentar a expressão de SOCS2 no SNC

Sabendo que o infiltrado de células no SNC no pico da doença leva a um aumento da expressão de SOCS2, procuramos investigar se apenas fatores liberados pelas células T produzidas pelo baço durante o desenvolvimento da EAE, era capaz de estimular a expressão de SOCS2.

Como resultados preliminares, após o cultivo de células da Glia e análise por Western Blott, observamos que as células da Glia em si expressam SOCS2 constitutivamente. No entanto, após obter e estimular as células da glia com sobrenadante dos esplenócitos de camundongo C57BL/6 induzido com EAE, observamos que fatores liberados por esplenócitos são capazes de potencializar a expressão de SOCS2 em células da Glia. Diante disso podemos sugerir que a expressão de SOCS2 pode ser potencializada além da interação entre células ativas, mas também diretamente por fatores liberados pelas células infiltradas no SNC durante a EAE (Figura 6).

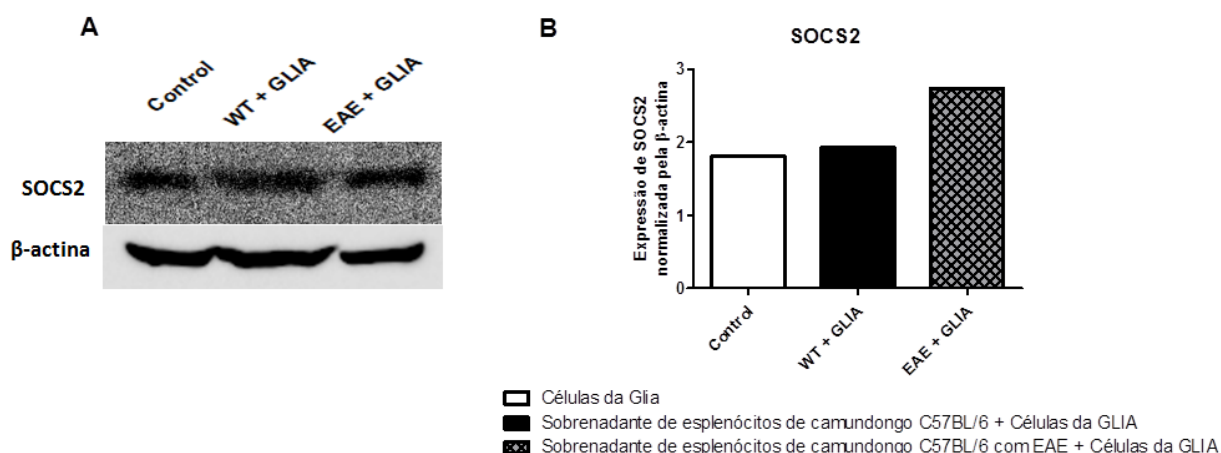


Figura 10. Expressão da proteína SOCS2 em células da Glia após estímulo com fatores liberados por esplenócitos ativos para EAE. A cultura de células da glia de cérebro de camundongos neonatos C57BL/6 (WT) foram estimuladas com o sobrenadante de esplenócitos retirados de animais C57BL/6 controle e induzidos com EAE após 14 dpi. Após 24h de estímulo, as células da glia estimuladas foram processadas para as análises por Western Blotting. **(A)** Expressão da proteína SOCS2. **(B)** Normalização da expressão da proteína SOCS2. A proteína β-actina foi usada como controle para normalização da proteína alvo. Os dados são representativos de um experimento preliminar e apresentado como médias +/- SEM.

6.7. A expressão do Fator Regulatório de Interferon 1 (IRF-1) é regulada por SOCS2 durante EAE

Estudos mostram que IRF-1 tem um papel importante no estabelecimento da EAE onde a expressão de IRF-1 induz a desmielinização de oligodendrócitos, ativação de caspase 1 e moléculas pró apoptóticas, dentre outras atividades durante a EAE, sendo que sua ausência leva a uma deficiência na geração de células Th1. (REN *et al*, 2010; REN *et al*, 2011). Por isso decidimos avaliar a expressão de IRF-1 durante o desenvolvimento da EAE na fase de pico. Através de análise por Western Blotting em cérebro, observamos que animais SOCS2^{-/-} controles já possuem expressão basal da proteína reduzida em comparação aos animais C57BL/6 controles (Figura 7 A e B). Já nos animais induzidos com EAE, observamos que os animais SOCS2^{-/-} tem uma menor expressão de IRF-1 quando comparado com os camundongos C57BL/6. Mostrando assim que a proteína SOCS2 tem um papel importante na modulação da expressão de IRF-1 durante o desenvolvimento da EAE.

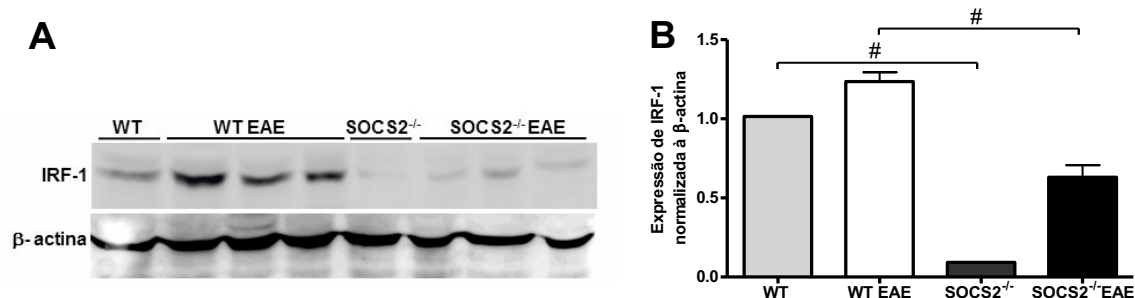


Figura 11. SOCS2 regula a expressão de IRF-1 durante EAE. O cérebro de camundongos C57BL/6 (WT) foram coletados e processados para as análises por Western Blotting. **(A)** Expressão da proteína IRF-1. **(B)** Normalização da expressão da proteína IRF-1. A proteína β-actina foi usada como controle para normalização das proteínas alvo. Dados representativos de um em dois experimentos independentes. # $p < 0.001$

6.8 SOCS 2 é essencial para a recuperação dos sinais clínicos durante a fase de remissão da doença

Posterior a fase de intensa inflamação e debilidade locomotora nos camundongos, ocorre o processo de regulação do processo inflamatório e remielinização. Essa etapa caracterizada como fase de remissão em animais C57BL/6, é fundamental para a recuperação da atividade motora dos camundongos. Então após avaliarmos a fase de pico da doença, nossos resultados previamente descritos (CRAMER, Allysson; OLIVEIRA, Bruno – paper em andamento), observamos que na fase de remissão, sendo avaliada até o 28º dia, que é o tempo suficiente para analisar a fase de remissão da doença, os camundongos SOCS2^{-/-} alcançam um exacerbado escore clínico tardiamente, no qual ocorre no 17º dpi, 3 dias após o pico do escore clínico dos camundongos C57BL/6. Porém após a fase de pico do escore clínico de ambos os grupos, observamos que camundongos SOCS2^{-/-} não foram capazes de recuperar dos danos locomotores como mostrado no escore clínico (Figura 8 A). Porém quando observado a perda de peso, bem como o ganho da massa corporal, os camundongos SOCS2^{-/-} apresentam menor perda e uma recuperação da massa bem mais rápida quando comparado com os camundongos C57BL/6 (Figura 8 B). Diante disso, infere-se que a proteína SOCS2 possui um papel importante tanto na fase aguda para o estabelecimento da doença, bem como na fase de

remissão no processo de recuperação do escore clínico nos camundongos, além do que parece ter um papel importante na regulação da massa corporal durante a EAE.

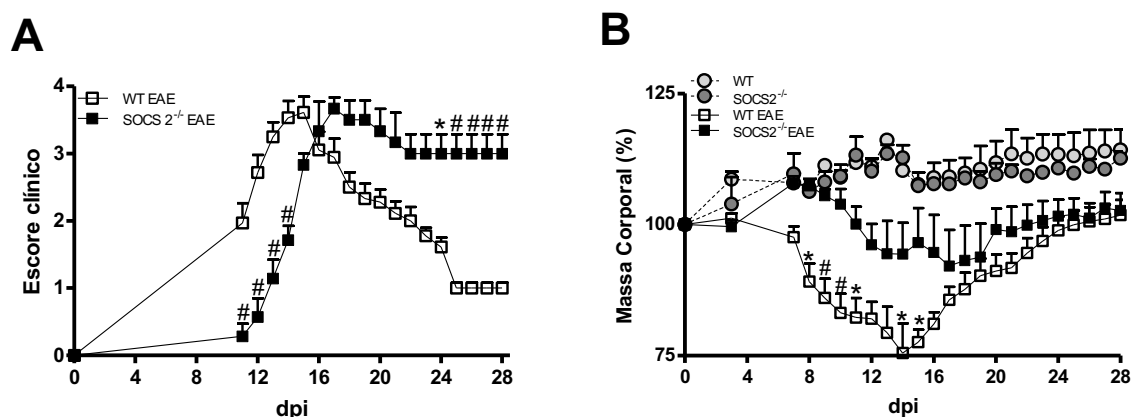


Figura 12. A ausência de SOCS2 leva a incapacidade de recuperação dos sinais clínicos-. Camundongos C57BL/6 (WT) e SOCS2^{-/-} receberam injeção subcutânea de MOG com CFA, e posteriormente aplicação de Toxina pertussis intraperitoneal para a indução de EAE. **(A)** Escore clínico **(B)** Massa Corporal, foram monitorados até 28 dpi. Os dados são representativos de um em três experimentos independentes e apresentados como médias $\pm$ SEM. * $p < 0.05$, # $p < 0.001$.

6.9.A ausência de SOCS2 acarreta em uma paralisia crônica dos membros inferiores

Como apresentado no escore clínico dos animais durante a fase de remissão, observou-se que a deficiência motora nos animais SOCS2^{-/-}, é bem maior do que quando comparado aos animais C57BL/6. Os camundongos SOCS2^{-/-} apresentaram na fase de remissão uma paralisia total da cauda, bem como a paralisia locomotora nas patas traseiras, sendo alguns casos recuperando o movimento parcial em uma das patas até o 28º dpi. Já os camundongos C57BL/6, observou-se até o 28º dpi, uma recuperação completa dos movimentos das patas traseiras e do andar, sendo que apenas algumas sequelas ainda permaneceram visíveis nos camundongos, sendo a paralisia total da cauda, sendo em alguns recuperando até o movimento da cauda parcialmente. As imagens dos camundongos durante a fase de remissão, mostra que SOCS2 é

extremamente importante para proporcionar a recuperação locomotora dos camundongos durante a fase de remissão da doença (Figura 9).

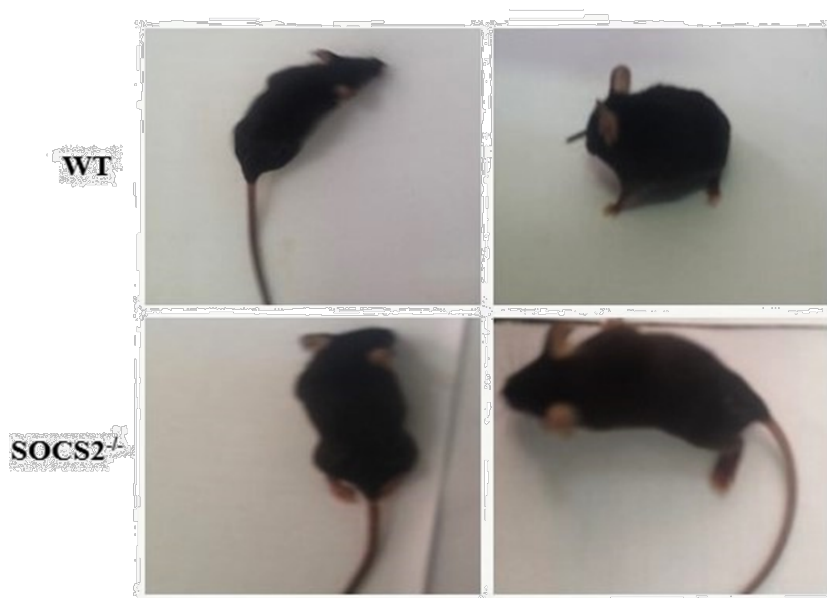


Figura 13.A deficiência de SOCS2 impossibilita a recuperação locomotora por completo durante a fase de remissão. Foram tiradas fotos representativas no 28º dpi, mostrando a recuperação locomotora em camundongos C57BL/6 e a paralisia em camundongos SOCS2^{-/-}. Os dados são representativos de um em três experimentos independentes.

6.10 O infiltrado celular e o perfil inflamatório aumenta na ausência de SOCS2 no SNC

Na fase de remissão a histologia da medula espinhal e do cérebro de ambos os grupos mostraram um infiltrado celular e um perfil inflamatório inverso ao mostrado na fase de pico da doença. Na fase de remissão da doença nossos resultados previamente descritos (CRAMER, Allysson; OLIVEIRA, Bruno – paper em andamento), foi possível observar que no cérebro de camundongos SOCS2^{-/-}, há um maior infiltrado e agrupamentos celulares, bem como um perfil inflamatório acentuado em relação aos camundongos C57BL/6. O mesmo se observa na medula espinhal onde camundongos SOCS2^{-/-}, onde é possível dimensionar um maior processo de desmielinização e apresentam uma meningiomielite intensa e extensiva, quando comparado aos camundongos C57BL/6 (Figura 10). Estes resultados da histologia corroboram com a

debilidade motora apresentada aos camundongos $SOCS2^{-/-}$, sendo observada pelo lesão causada pelo grande infiltrado celular e inflamação.

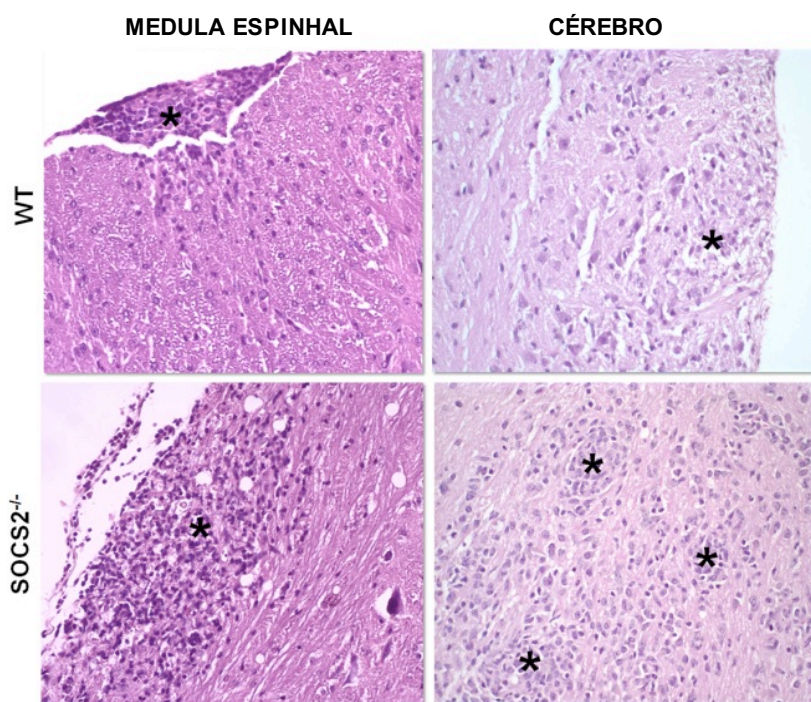


Figura 14. A ausência de SOCS2 em camundongos leva a um elevado nível de inflamação no SNC durante fase de remissão da EAE. Foi realizado a análises histológicas de secções de cérebro (região do tronco cerebral) e medula espinhal de camundongos C57BL/6 (WT) e $SOCS2^{-/-}$. Mostrando que no Cérebro: camundongos C57BL/6 induzidos com EAE mostraram encefalite moderada (*). Camundongos $SOCS2^{-/-}$ induzidos com EAE mostraram infiltrado inflamatório médio (*). E na Medula espinhal: camundongos C57BL/6 induzidos com EAE demonstraram meningo-myelite focal moderada (*). E camundognos $SOCS2^{-/-}$ com EAE apresentaram desmielinização e meningo-myelite intensa e extensiva (*). Ampliação original: 100x. Os dados são representativos de um em três experimentos independentes.

6.11 A deficiência de SOCS2 leva a uma redução na geração/expansão de células T $CD4^{+}$ e $CD8^{+}$ no baço

A apresentação de mielina para as células nos órgãos linfóides, são importantes para a ativação de células naive e na expansão dessas células, permitindo assim a migração delas para o SNC. Diante disso investigamos pela análise de citometria de fluxo a geração e expansão de populações de células T $CD4^{+}$ e $CD8^{+}$, principais no processo inflamatório e para o desenvolvimento da doença. Para investigar o perfil dessas células realizamos a análise através da extração de linfócitos do baço no dia correspondente

como da fase de pico da doença (14^o dpi) e no dia correspondente à fase de remissão da doença (28^o dpi). Nós observamos que camundongos SOCS2^{-/-} apresentaram uma redução na frequência de células T CD4 produtoras de IFN- γ e de células T CD8 produtoras de IFN- γ durante a fase de pico da doença, quando comparados com camundongos C57BL-6 (Figura 11 A e B). Já na fase de remissão observamos que apenas células T CD8 produtoras de IFN- γ apresentavam menor frequência de células quando comparados com os camundongos C57BL-6 (Figura 11 A e B).

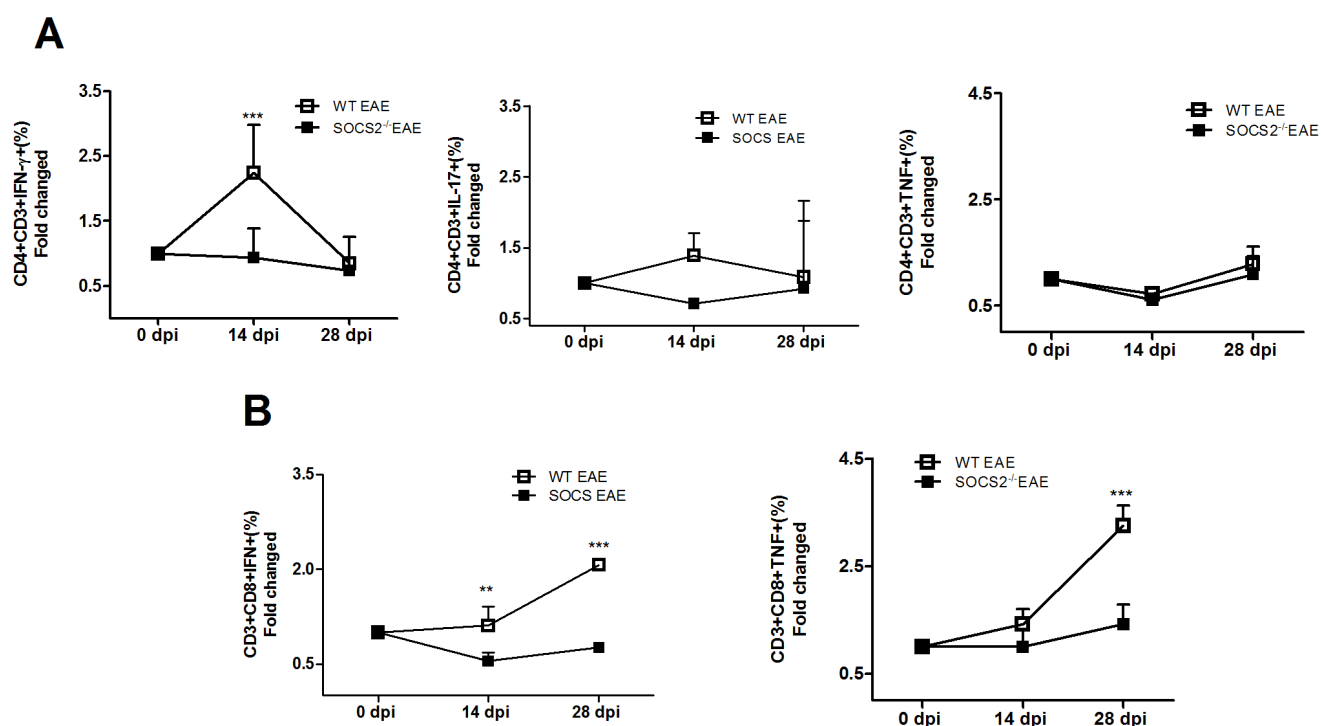


Figura 15. Camundongos SOCS2^{-/-} apresentam redução na geração e expansão de populações de células T CD4 e CD8 no baço durante as fases de pico e de remissão da doença. No 14^o dpi e 28^o, o baço de camundongos C57BL/6 (WT) e SOCS2^{-/-} foram coletados, processados e submetidos a análise por citometria de fluxo. A porcentagem de células (A) CD3⁺CD4⁺IFN- γ ⁺, CD3⁺CD4⁺TNF⁺, CD3⁺CD4⁺IL-17⁺ e (B) CD3⁺CD8⁺IFN- γ ⁺, CD3⁺CD8⁺TNF⁺, foram avaliadas no baço. (N= 3 animais por grupo). Os dados são representativos de um de dois experimentos independentes. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001

6.12 Camundongos SOCS2^{-/-} apresentam um menor perfil e infiltrado de células T inflamatórias no SNC

Como mostrado anteriormente na histologia, o infiltrado celular é um dos fatores importantes para que aconteça o desenvolvimento da doença. No entanto a presença de células T CD4 ativas contra a mielina no SNC são fundamentais para levar a ativação das células residentes, bem como intensificar o recrutamento de mais células, proporcionando assim uma alta resposta inflamatória no tecido, ocasionando na desmielinização e lesões teciduais.

Para avaliar e investigar os principais tipos de populações de células inflamatórias que promovem o desenvolvimento e propagação do processo inflamatório na EAE, nós realizamos uma análise por citometria de fluxo, através da extração de linfócitos da medula espinhal, como também para o cérebro no dia correspondente como da fase de pico da doença (14º dpi) e no dia correspondente à fase de remissão da doença (28º dpi). As análises por citometria de fluxo demonstrou que camundongos SOCS2^{-/-} apresentam uma redução do infiltrado de populações de células T inflamatórias durante a fase de pico da doença, mostrando que a frequência de células T expressando IFN- γ , IL-17 e TNF foram reduzidas em amostras de medula espinhal, tendo no cérebro a redução apenas de células T expressando IFN- γ , IL-17, quando comparado com os animais C57BL/6 (Figura 12 A e B). No entanto na fase de remissão da doença observou-se que apenas a frequência de células T expressando IL-17 se apresentava reduzida nos animais SOCS2^{-/-}, tanto na medula espinhal como no cérebro, quando comparado com os animais C57BL/6 (Figura 12 A e B). Estes resultados mostram que a alta frequência dos subtipos de células T inflamatórias (Th1 produzindo IFN- γ ou TNF e Th17 produzindo IL-17) nos camundongos C57BL/6 na fase de pico da doença (14º dpi), é crucial para determinar o aparecimento dos sinais clínicos mais cedo quando comparado com os camundongos SOCS2^{-/-}, no entanto na fase de remissão, momento no qual os camundongos SOCS2^{-/-} se encontram com uma constante debilidade motora, não se observa um aumento na frequência dessa populações de células T nos camundongos SOCS2^{-/-}, podendo sugerir que a possível causa da deficiência motora seja o dano exacerbado causado durante a o período de pico da doença nesses camundongos que ocorreu no 17º dpi.

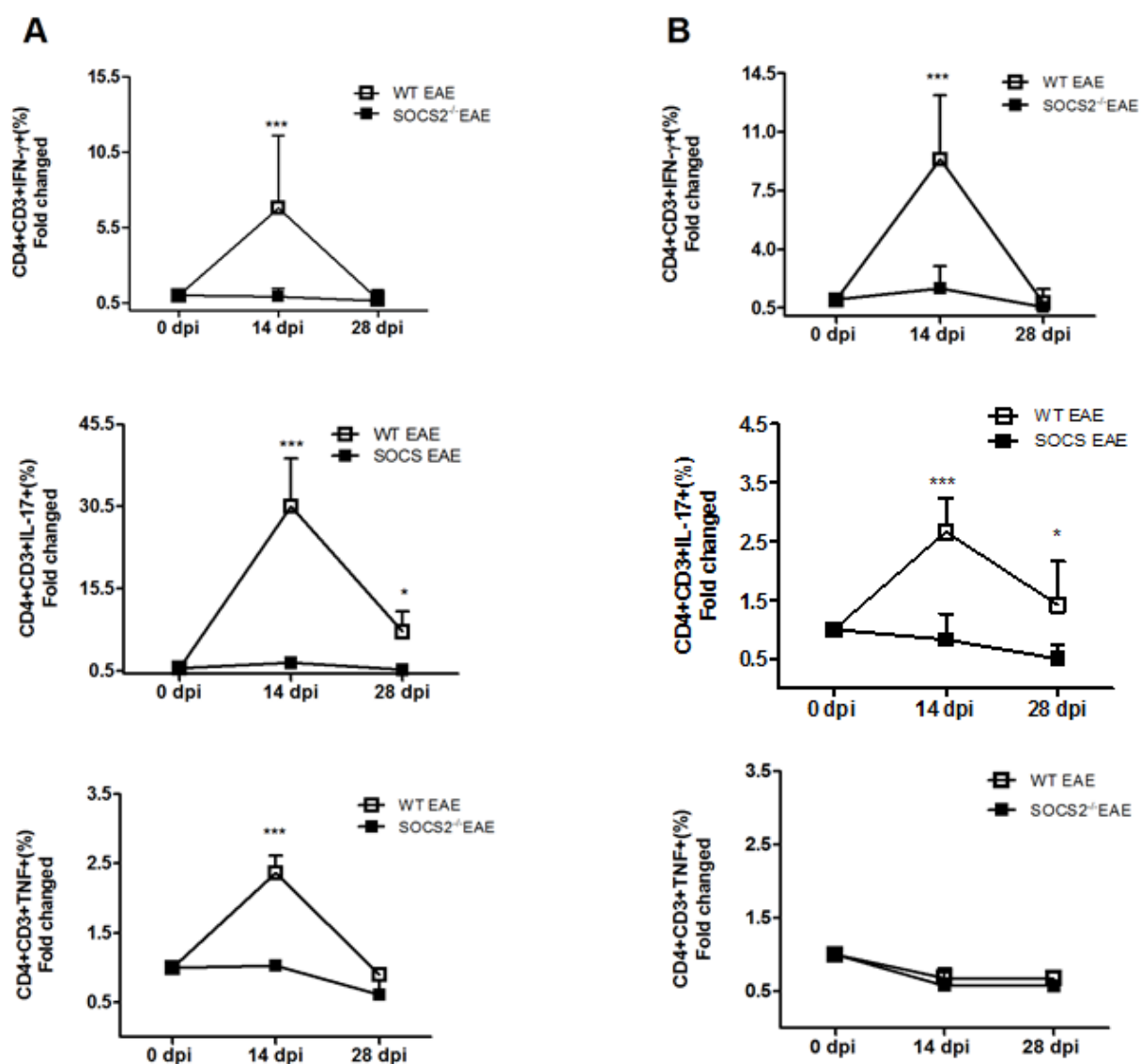


Figura 16. A expressão de SOCS2 regula o infiltrado de linfócitos T no SNC durante a fase de pico da doença. No 14º dpi e 28º, a medula espinhal e o cérebro de camundongos C57BL/6 (WT) e SOCS2^{-/-} foram coletados, processados e submetidos a análise por citometria de fluxo. A porcentagem de células CD3⁺CD4⁺IFN- γ ⁺, CD3⁺CD4⁺TNF⁺ e CD3⁺CD4⁺IL-17⁺, foram avaliadas na (A) medula espinhal, e no (B) cérebro. (N= 3 animais por grupo). Os dados são representativos de um de dois experimentos independentes. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001

6.13 Células T CD8 produtoras de TNF está aumentada na medula espinhal durante a fase de pico e de remissão da doença

Posteriormente, fizemos a análise das populações de linfócitos T CD8 no cérebro e medula espinhal dos camundongos, nos respectivos dias correspondente como da fase de pico da doença (14º dpi) e no dia correspondente à fase de remissão da doença (28º dpi). As análises mostraram que camundongos SOCS2^{-/-} demonstraram uma maior frequência de linfócitos T CD8 produtores de TNF na medula espinhal, tanto na fase de pico quanto em relação a fase de remissão, quando comparado com camundongos C57BL/6 (Figura 13 A). No entanto, as populações de células T CD8 produtoras de IFN- γ na fase de remissão, demonstraram menor frequência tanto na medula espinhal como no cérebro quando comparado com camundongos C57BL/6 (Figura 13 A e B).

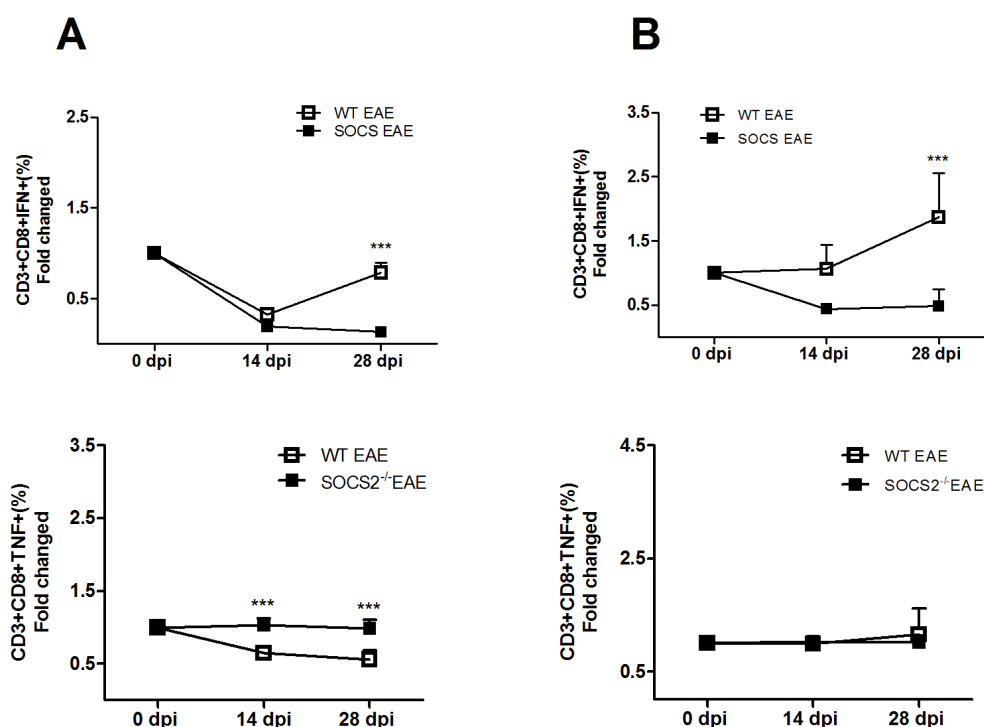


Figura 17. A população de linfócitos T CD8 tem uma frequência maior na medula espinhal de animais SOCS2^{-/-} na fase de pico e de remissão. No 14º dpi e 28º dpi, a medula espinhal e o cérebro de camundongos C57BL/6 (WT) e SOCS2^{-/-} foram coletados, processados e submetidos a análise por citometria de fluxo. A porcentagem de células CD3⁺CD8⁺IFN- γ ⁺, CD3⁺CD8⁺TNF⁺, foram avaliadas na (A) medula espinhal, e no (B) cérebro. (N= 3 animais por grupo). Os dados são representativos de um de dois experimentos independentes. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001

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

Sabendo que a produção de citocinas anti-inflamatórias e a ativação de células Treg são importantes para o controle e balanço da resposta inflamatória durante a EAE, decidimos investigar o perfil dessas respostas moduladoras no baço e no SNC. Analisando na cinética do 14º e 28º dpi como descrita já anteriormente, observamos que no cérebro a frequência de células Treg no cérebro está reduzida em camundongos SOCS2^{-/-} durante a fase de pico, quando comparada em relação aos camundongos C57BL/6 (Figura 14 C). Isso mostra a importância das células Treg modulando o perfil inflamatório no cérebro na fase de pico da doença, afim de promover uma recuperação dos danos e do processo inflamatório no SNC. Porém, no baço a frequência da expansão de células Treg em camundongos SOCS2^{-/-} está aumentada em relação aos camundongos C57BL/6 na fase de remissão da doença (Figura 4 A). Embora haja um aumento da expansão de células Treg no baço na fase de remissão, as análises não mostraram um aumento dessas células no SNC, sendo assim um fator limitante para a modulação do processo inflamatório, bem como a recuperação dos animais SOCS2^{-/-} nesta fase. Já a frequência de células T CD4 produtoras de IL-10 não apresentaram diferenças em ambos os grupos em nenhum dos órgãos analisados.

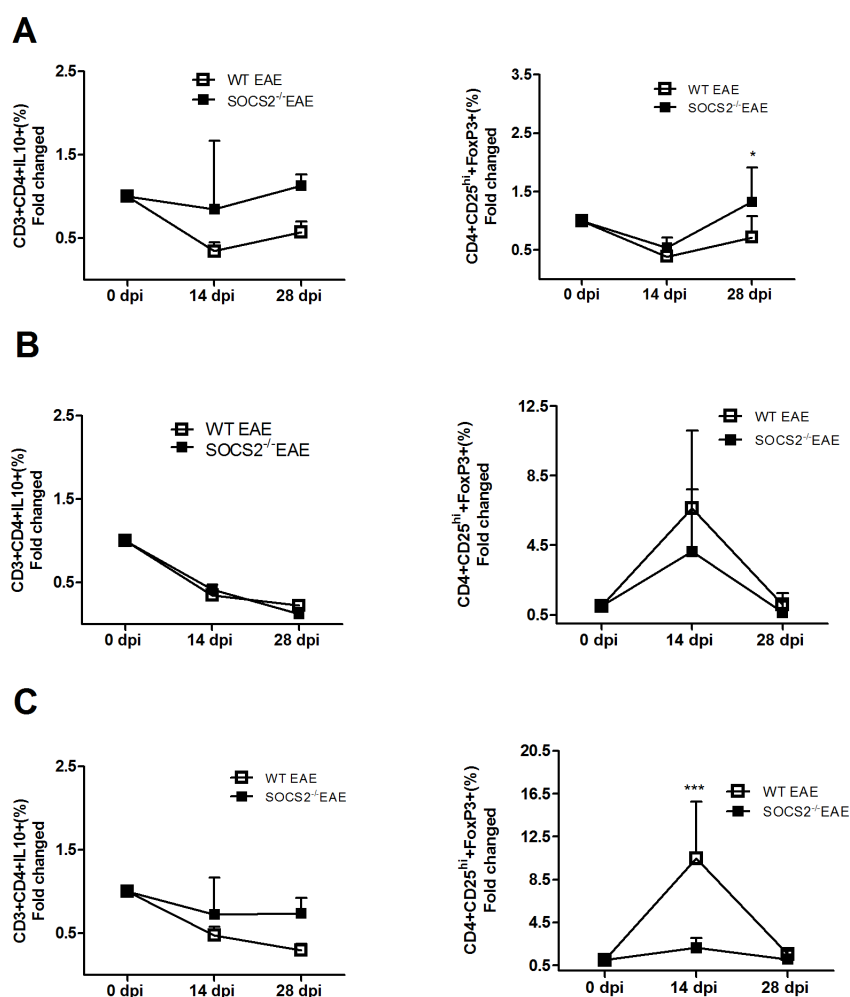


Figura 18. SOCS2^{-/-} aumenta a expansão de células Treg na fase de remissão, porém não é aumentada no SNC. No 14º dpi e 28º dpi, a medula espinhal e o cérebro de camundongos C57BL/6 (WT) e SOCS2^{-/-} foram coletados, processados e submetidos a análise por citometria de fluxo. A porcentagem de células CD3⁺CD4⁺IL-10⁺, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, foram avaliadas no (A) Baço, na (B) medula espinhal, e no (C) cérebro. (N= 3 animais por grupo). Os dados são representativos de um de dois experimentos independentes. **p* <0.05, ***p* <0.01, ****p* <0.001

6.15 Células SOCS2^{-/-} transferidas para camundongos WT, aumenta a severidade e induz letalidade

Após a aplicação da radiação nos camundongos C57BL/6 e SOCS2^{-/-}, realizando a depleção das células da medula óssea e posteriormente a transferência adotiva de células da medula óssea para camundongos irradiados, aguardou 3 semanas para o povoamento das células transferidas na medula óssea. Após o povoamento realizou-se a

imunização nos camundongos e foram avaliados os sinais clínicos e a perda de peso. Observamos após a imunização que camundongos C57BL/6 que receberam a transferência de células SOCS2^{-/-}, apresentaram uma severidade maior da doença, onde na fase de pico da doença observou a letalidade dos mesmos. Já camundongos SOCS2^{-/-} que receberam a transferência de células C57BL/6, apresentaram uma menor severidade da doença, apresentando uma letalidade de 25% apenas, porém observando que esses camundongos eram impossibilitados de se recuperarem sua atividade locomotora após a fase de pico da doença. Quando avaliada o percentual de evolução da massa corporal durante o desenvolvimento da doença, observou-se que a perda da massa corporal era proporcional à severidade da doença, sendo que em ambas quimeras a perda de peso foi similar (Figura 19 C). Os camundongos SOCS2^{-/-} apresentavam uma perda de massa corporal bem reduzida nos primeiros dias da sintomatologia quando comparada aos camundongos C57BL/6, onde apresentaram uma perda de peso acentuada até o 14º dpi (Figura 4 B).

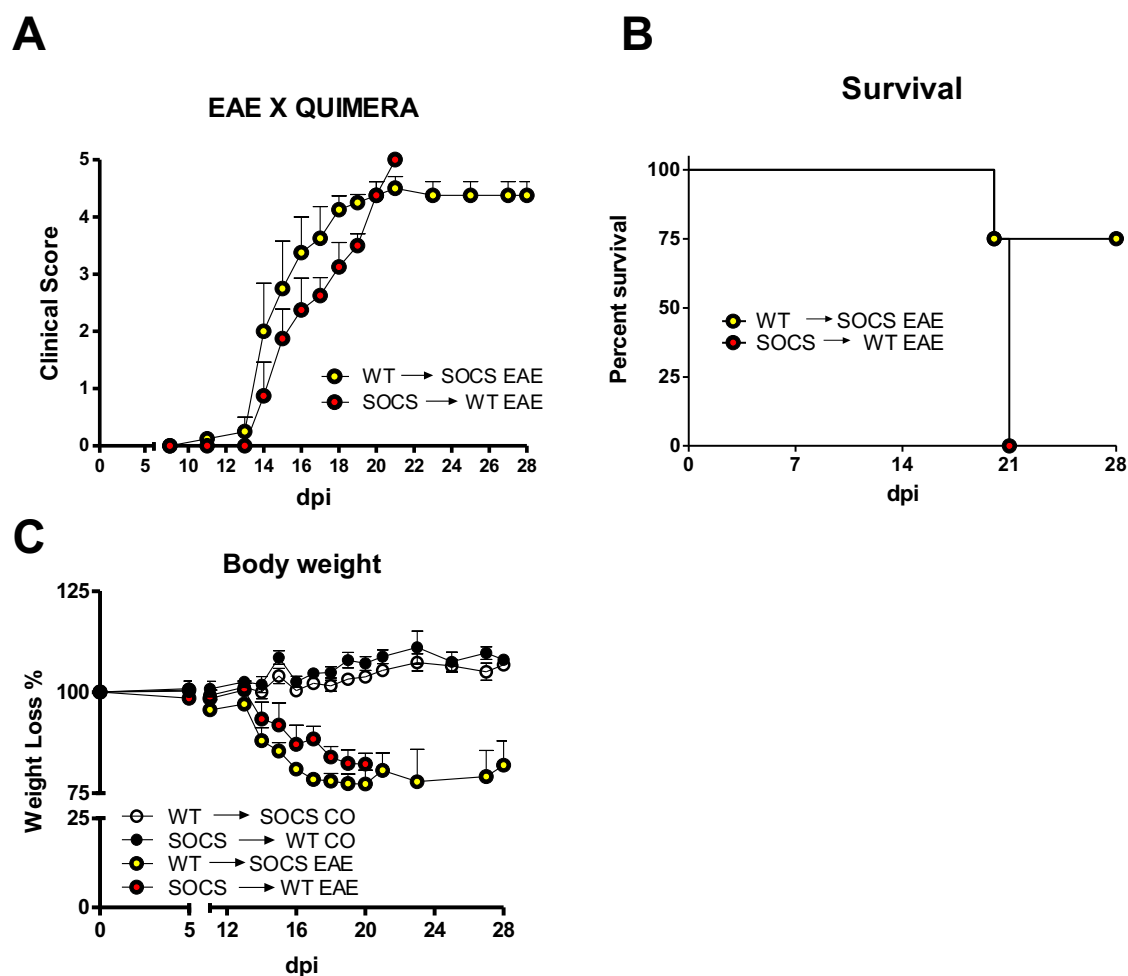


Figura 19. A transferência de células SOCS2^{-/-} para camundongos C57BL/6 exacerba os sinais clínicos levando a uma letalidade. Camundongos C57BL/6 (WT) e SOCS2^{-/-} receberam radiação em um total de 7 gray, foram submetidos a transferência de células adotivas e após 3 semanas receberam uma injeção subcutânea de MOG com CFA, e posteriormente aplicação de Toxina pertussis intraperitoneal para a indução de EAE. **(A)** Escore clínico, **(B)** Sobrevivência, **(C)** Massa Corporal, foram monitorados até 28 dpi. Os dados são representativos de um em dois experimentos independentes e apresentados como médias $\pm$ SEM. (WT $\rightarrow$ SOCS / células de camundongos WT transferidas para camundongos SOCS2^{-/-}), (SOCS $\rightarrow$ WT / células de camundongos SOCS2^{-/-} transferidas para camundongos WT).

7 Discussão

Durante o curso da EAE observamos que a proteína SOCS2 tem uma dupla atividade. No qual a expressão da proteína SOCS2 em camundongos C57BL/6 na fase inicial dos sinais clínicos da doença entre o 11º dpi até a fase de pico da doença que ocorreu no 14º dpi, mostraram uma maior expressão nos cérebros dos camundongos, mostrando assim que a proteína SOCS2 tem um papel importante para o estabelecimento da doença, levando a uma rápida severidade quando comparado com os camundongos SOCS2^{-/-}, que apresentam um retardo no aparecimento dos sinais clínicos e da fase de pico da doença. No entanto estudos envolvendo o papel da proteína SOCS2 em outros modelos, como na Malária Cerebral, demonstraram que camundongos SOCS2^{-/-} infectados com *Plasmodium berguei* ANKA mostraram uma resistência inicial à infecção, bem como ao aparecimento dos sinais clínicos da malária cerebral durante a fase aguda da doença (BRANT *et al.*, 2016).

Além do processo inflamatório causado pelas células ativas contra a mielina no SNC, a sinalização e processamento da mielina nas APCs são importantes não apenas para a apresentação do antígeno, mas em estimular uma gama de respostas em si. Estudos anteriores já demonstravam que macrófagos de ratos após serem estimulados com fluido cerebrospinal contendo anticorpos contra a mielina e micróglia eram capazes de se ligar e fagocitar mielina (SOMMER, FORNO, SMITH, 1992). Posteriormente observaram que as micróglias também eram capazes de realizar a mesma função, sendo observado também que os astrócitos diretamente colaboram com um aumento na atividade fagocítica, pelo que parece devido a expressão de moléculas de adesão e fatores solúveis liberados pelos astrócitos (SMITH, 1992; SMITH, HOERNER, 2000). Observando assim que durante a fase aguda da EAE a expressão de SOCS2 era aumentada, questionamos se além do processo inflamatório, epítomos de mielina seriam capazes de ativar a expressão de SOCS2. Diante disso, após o estímulo com epítomos de mielina observamos que a expressão de SOCS2 era potencializada quando estimuladas em células da glia. Esses resultados corroboram diante de estudos que mostram que, quando micróglias são expostas à MBP (proteína de mielina básica) in vitro, acarreta em um aumento da produção de citocinas como IL-1, IL-6 e TNF (WILLIAMS, *et al.*, 1994), sendo que estudos mais recentes mostram que essas mesmas

citocinas estimulam a expressão de SOCS2 em diversos tipos celulares (RICO-BAUTISTA, FLORES-MORALES, FERNANDÉZ-PÉREZ, 2006). Podendo sugerir que a ativação da expressão de SOCS2 na cultura de células da glia está intimamente ligada a produção dessas citocinas inflamatórias após a fagocitose da mielina.

Estudos mostram que diversos fatores são capazes de ativar a expressão de SOCS2, bem como a ativação de receptores TLR (POSSELT *et al.*, 2011), diversos hormônios e citocinas (RICO-BAUTISTA, FLORES-MORALES, FERNANDÉZ-PÉREZ, 2006). Além de observarmos que MOG era capaz de ativar SOCS2 em células da glia, nosso questionamento agora era se apenas fatores liberados pelas células do baço ativas contra mielina durante a EAE, eram capazes de ativar a expressão de SOCS2 em células da glia. Observamos que apenas o sobrenadante contendo mediadores produzidos por células do baço eram capazes de potencializar a expressão de SOCS2 em células da glia. Isto mostra que a expressão de SOCS2 mediada pelo infiltrado de células e pela produção de mediadores das células do baço são importantes durante o desenvolvimento da doença.

Quando observado a perda de peso e a recuperação da massa corporal, os resultados mostraram que camundongos SOCS2^{-/-} tem uma menor perda de peso durante o percurso da doença quando comparado com os camundongos C57BL/6, mesmo apresentando uma deficiência locomotora constante na fase de remissão da doença. Isto pode ser explicado pelo fato de alguns estudos mostrarem que animais SOCS2^{-/-} apresentam uma maior facilidade de ganhar massa corporal quando comparados com animais C57BL/6 (METCALF *et al.*, 2000).

O infiltrado de células T durante o desenvolvimento da doença é extremamente importante para proporcionar um processo inflamatório e desmielinização no SNC. Observamos que durante a fase de pico da doença os camundongos C57BL/6 além de apresentarem um maior infiltrado de células mononucleares tanto no cérebro como na medula espinhal, apresentaram um aumento na expressão dos subtipos celulares de células Th1 expressando IFN- γ e TNF e de células Th17 no cérebro, além de um aumento de células Th1 expressando IFN- γ e de células Th17 na medula espinhal quando comparado com camundongos SOCS2^{-/-}, demonstrando assim que o aumento da

expressão dessas células no SNC no 14º dpi, infere consequentemente no pior escore clínico nos animais C57BL/6, como observado em vários estudos (ROSTAMI, CIRIC, 2013; LEGROUX, ARBOUR, 2015). Resultados também do nosso grupo durante a infecção por *Plasmodium berguei* ANKA mostraram que camundongos SOCS2^{-/-} infectados, apresentaram resistência inicial à produção de TNF, TGF-β, IL-12 e IL-17 no cérebro (BRANT *et al.*, 2016).

Além de observar o perfil inflamatório no SNC, observamos também que a expressão de IRF-1 no cérebro de camundongos SOCS2^{-/-} apresentaram uma menor expressão, tanto basalmente em camundongos controle, como em camundongos induzidos com EAE quando comparados com camundongos C57BL/6. Sugerindo assim que SOCS2 regula de alguma forma a expressão de IRF-1 no SNC. Estudos já mostraram que IRF-1 regula a desmielinização inflamatória e a gravidade da doença independentemente das células imunes periféricas (RHEN *et al.*, apr 2011), além de levar a piroptose de oligodendrócitos (RHEN *et al.*, jun 2011; LODA, BALABANOV, 2012). Porém se IRF-1 é importante como um fator inflamatório na fase inicial da doença, estudos recentes mostram que IRF-1 é fundamental para a recuperação da doença, sendo um regulador transcricional para a diferenciação de células T reguladoras 1 produtoras de IL-10 (Tr1), onde mostraram que IRF1 é requerido para a geração de células Tr1 *in vitro* e *in vivo*. Isso foi mostrado quando camundongos IRF1^{-/-} com EAE desenvolvem uma doença clínica muito grave e não conseguem recuperar, observando que a sobre-expressão de IRF1 durante a diferenciação Th17 suprime a indução de ambos os receptores IL17 e IL23 (KARWACZ, YOSEF, KUCHROO, 2013). Diante disso podemos inferir que a ausência de SOCS2 reduz a ativação de IRF-1 durante a fase inicial da doença retardando o aparecimento dos sinais clínicos, por outro lado sendo diretamente prejudicial para a fase de remissão da doença.

Sabendo-se que a expressão de moléculas coestimulatórias como CD40, são extremamente importantes para ativação e a geração desses subtipos celulares, onde a expressão aberrante de CD40 está implicada em doenças incluindo a EM, Artrite reumatóide e doença de Alzheimer, sendo sua inibição da sinalização de CD40 gera efeitos benéficos. Estudos mostraram que em respostas imunológicas de macrófagos e microglias no SNC, SOCS1 e SOCS3 promoveram a redução da expressão de MHC

classe II e CD40, suprimindo deste modo a atividade do sistema imunitário (QIN *et al.*, jan 2006; QIN *et al.*, may 2006). Como já demonstrado que SOCS2 automodula a expressão de SOCS1 e SOCS3, parece que SOCS2 tem um papel importante na modulação na expressão de CD40. Já em resultados recentes do nosso grupo, a ausência de SOCS2 durante a resposta imune adaptativa, demonstraram níveis reduzidos da expressão MHC II em células dendríticas DCs, durante a infecção por *Trypanosoma cruzi* (ESPER *et al.*, 2016). Podendo inferir que SOCS2 tem um papel importante na regulação da expressão de moléculas importantes na apresentação de antígenos, importante para a ativação e desenvolvimento de células durante a fase de pico da doença.

Através dos resultados durante a fase de pico da doença, observa-se que, SOCS2 regula a chegada dessas células no SNC, resultando em inflamação nesse sítio. Na fase de remissão observamos que camundongos SOCS2^{-/-} foram incapazes de se recuperarem dos sinais clínicos da doença, apresentando um escore clínico acentuado e prolongado. Estudos também mostram que pacientes com EM apresentavam uma menor expressão de SOCS2, sendo essa redução acarretou em uma pior inflamação e um pior curso de doença, sendo os níveis basais mais baixos nos doentes com um curso de doença mais maligna do que nos doentes com um curso de doença mais benigna (GILLI *et al.*, 2010; GILLI *et al.*, 2011).

Analisando a fase de remissão da doença, observou-se no 28º dpi a recuperação dos sinais clínicos da doença nos camundongos C57BL/6, onde apresentaram um menor infiltrado de células e uma redução na geração e expansão de células Th1 e Th17 nesta fase quando comparada com a fase de pico da doença em relação aos camundongos SOCS2^{-/-}. Isto pode ser explicado pelo fato de células Treg apresentarem uma alta frequência no SNC quando observado no 14º dpi, onde estudos mostram que a presença de células Treg no SNC medeiam a recuperação da EAE controlando a produção, proliferação e motilidade das citocinas produzidas pelas células T efectoras no SNC (ZOZULYA, WIENDL, 2008; KOUTROLOS *et al.*, 2014). Já em resultados do nosso grupo avaliando a fase tardia da infecção por *Plasmodium berguei* ANKA, mostraram que camundongos SOCS2^{-/-} apresentavam uma parasitemia aumentada e infiltração de células Treg reduzida, associada com níveis aumentados de células Th1 e Th17 e

citocinas relacionadas, como IL-17, IL-6 e TGF- β no cérebro. Além de ser observado uma redução significativa nos fatores neurotróficos protetores do SNC, tais como o fator neurotrófico derivado da linha celular glial (GDNF) e o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (BRANT *et al.*, 2016). Estes dados sugerem ter uma resposta inflamatória similar em camundongos SOCS2^{-/-} com EAE, no entanto esse perfil deve ser investigado em uma cinética anterior ao 28º dpi, sendo esse período de aumento de células pró-inflamatórias provavelmente estar ocorrendo durante o intervalo de pico da doença nesses camundongos entre 17º dpi.

Um fator que pode corroborar pelo fato pelo dos camundongos SOCS2^{-/-} apresentarem um maior escore clínico é que as células T CD8 produzindo TNF não apresentam redução no 28º dpi quando comparado com os camundongos C57BL/6, sendo que publicações já mostraram que o TNF produzido pelas células mielóides acelerou o aparecimento da doença pela regulação da expressão das quimiocinas no SNC, onde o TNF produzido pelas células T exacerbou o dano ao SNC durante a EAE regulando a infiltração de células mielóides inflamatórias (KRUGLOV *et al.*, 2011). No entanto quando observado no baço, os resultados apontaram um aumento na expansão de células T CD8 expressando TNF no 28º dpi em camundongos C57BL/6, porém estudos demonstram que no baço o TNF tem uma ação contrária em relação ao seu efeito no SNC, onde apresenta um fator importante na regulação da ativação de células inflamatórias, onde em órgãos linfóides secundários, o TNF expresso por células mielóides e células T agem em sinergia para reduzir a produção de IL-12p40 e IL-6 por APCs, inibindo subsequentemente o desenvolvimento de respostas de células Th1 e Th17 (KRUGLOV *et al.*, 2011). Diante disso é notório o papel crucial das células T CD8 na formação de placas e danos neuronais quando presente no SNC (STEINMAN, 2001; GOVERMAN, PERCHELLET, HUSEBY, 2005; RUSEBY *et al.*, 2012) podendo assim inferir ser um dos mecanismos no qual leva aos camundongos SOCS2^{-/-} apresentar um escore clínico maior na fase de remissão, tendo um papel inverso nos camundongos C57BL/6, onde a alta expressão de TNF no baço ser um indício para inibir o desenvolvimento de células Th1 e Th17, reduzindo assim a inflamação no SNC.

Avaliando o perfil de células T CD8⁺ observamos um aumento da expressão dessas células expressando IFN- γ no SNC, tanto no cérebro, medula espinhal e no baço durante a fase de remissão. Embora o papel das células T CD8⁺ geralmente estão ligados ao processo de citotoxicidade, desmielinização e diretamente predominantes nas lesões causadas no SNC (FRIESE, FUGGER, 2005). Porém estudo recentes tem mostrado que Treg CD8⁺ tem um papel importante na supressão da doença (CHEN *et al.* 2009; SINHA, ITANI, KARANDIKAR, 2013). Porém novos achados identificaram um novo subconjunto de Treg CD8⁺ que expressam um peptídeo associado a latência (LAP) na sua superfície celular (células CD8⁺ LAP⁺), sendo que quando utilizados num modelo de co-transferência adoptiva, essas células produtoras de TGF- β e IFN- γ , foram capazes de suprimir respostas imunes específicas contra a mielina, por indução ou expansão de células Foxp3⁺ e por inibição da proliferação e produção de IFN-gama *in vivo* (CHEN *et al.* 2009). Sendo assim torna-se necessário investigar o perfil correto dessas células T CD8 produtoras de IFN- γ aumentadas durante a fase de remissão no SNC e no baço, através da análise da expressão de LAP.

Apesar de observar um aumento na expansão de células Treg no baço de camundongos SOCS2^{-/-}, não observou o aumento dessas células no SNC quando investigado no 28º dpi. Esta deficiência de células Treg no SNC pode ser explicada pelo fato de estudos mostrarem que SOCS2 é altamente expresso em iTregs (células T reguladoras induzidas) e que células T CD4 deficientes em SOCS2 não conseguem manter a expressão estável de Foxp3 em iTregs *in vitro* e *in vivo*, mostrando que SOCS2 é essencial para manter o fenótipo anti-inflamatório de iTregs, impedindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ (KNOSP *et al.*, 2013). Além do mais que estudos onde mostram a ausência da atividade de Tregs exacerba a severidade da EAE, bem como a inflamação no SNC (MCGEACHY, STEPHENS, ANDERTON, 2005; KOUTROULOS *et al.*, 2014). Por isso sugerimos que a instabilidade de células iTregs é um dos fatores principais que impedem a regulação das células ativas contra a mielina e do processo inflamatório no SNC, bem como a recuperação dos danos causados durante a fase de pico da doença.

Os resultados obtidos pela indução da doença através de quimeras, mostraram que a transferência de células SOCS2^{-/-} para camundongos WT geram uma maior severidade durante a fase de pico acarretando na letalidade dos animais. Como mostrado nos nossos resultados que SOCS2 tem um papel importante no aparecimento dos sinais clínicos e no estabelecimento da EAE através da ativação de IRF-1 no SNC, além de estudos mostrarem que a ausência de SOCS2 nas células produzidas e expandidas nos órgãos linfóides leva a instabilidade nas células Tregs e proporciona a produção de IFN- γ por elas (KNOSP *et al.*, 2013), sugerimos assim que os camundongos que receberam células SOCS2^{-/-} apresentam uma maior inflamação, tendo uma deficiência na regulação do processo inflamatório no SNC. Já os camundongos SOCS2^{-/-} que receberam células de WT, também apresentaram uma alta severidade da doença durante a fase de pico, porém não acarretou em uma total letalidade nos camundongos SOCS2^{-/-}. Podendo sugerir que as células Tregs produzidas e expandidas nos órgãos linfóides expressando SOCS2 permite uma melhor estabilidade na atividade dessas células (KNOSP *et al.*, 2013), sugerindo também ser importante a estabilidade dessas células para a aderência e acúmulo no SNC, onde estudos com pacientes mostram que na EM, observa-se um maior número de Tregs no fluido cerebrospinal, onde expressavam mais moléculas de adesão em resposta a tecidos inflamados como CD103 e CD49d, mostrando assim que essas células se acumulam no SNC afim de regular a inflamação (VENKEN *et al.*, 2008), impedindo que haja uma inflamação exacerbada levando a letalidade da doença. Além disso, podemos observar que ausência da expressão de SOCS2 no SNC é fundamental para que haja a regeneração do tecido danificado e recuperação e dos sinais clínicos da doença.

Afim de melhor compreender os possíveis mecanismos no qual a ausência de SOCS2 durante a EAE leva a uma deficiência na recuperação dos sinais clínicos da doença, observamos em alguns estudos com EAE, no qual também mostram que em alguns modelos na EAE que progridem para uma fase crônica são geralmente acometidos por uma desmielinização extensa, onde os danos oxidativos causados e a presença de agregados de mielina acumulada no SNC impedem a inserção e compactação de uma nova bainha de mielina (FRID *et al.*, 2015), ou que demonstraram uma desmielinização

crescente e patologia axonal, sendo até difícil avaliar com exatidão a extensão do edema parenquimatoso ou grau de inflamação (PRINZ *et al.*, 2015).

Evidências crescentes mostram que a perda apoptótica de neurônios no córtex cerebral contribuem para a disfunção neurológica em pacientes com EM (PETERSON *et al.*, 2001; CHANG *et al.*, 2008), sendo também na EAE o dano e a perda apoptótica neuronal serem os principais contribuintes para a incapacidade progressiva e permanente (KURNELLAS, DONAHUE, ELKABES, 2007; LASSMANN, 2009). Além do mais, estudos mostram que os neurônios, tem funções extremamente importante também na remielinização, onde a comunicação entre neurônios e oligodendrócitos é essencial para a geração de mielina, onde moléculas de sinalização e fatores tróficos como PDGF, FGF-2, IGF-1, NT-3 e CNTF de sinalização derivadas de neurônios e astrócitos regulam a proliferação, diferenciação e sobrevivência de oligodendrócitos (SIMONS, TRAJKOVIC, 2006). Porém um estudo envolvendo o papel de SOCS2 em neurônios demonstraram que camundongos que possuem alta expressão da proteína SOCS2 (SOCS2Tg - overexpressing) apresentam aumento das projeções (GOLDSHMIT *et al.*, apr 2004; GOLDSHMIT *et al.*, nov 2004) e da sobrevivência dos neurônios gerados durante a neurogênese hipocampal adulta (AHN) (RANSOME, TURNLEY, 2008), enquanto que em camundongos SOCS2^{-/-} apresentam um número reduzido de neurônios gerados durante a AHN (BASRAI *et al.*, 2016). Esses dados concomitantemente com nossos resultados sugerem que a ausência de SOCS2 no SNC na fase de remissão pode estar associada com a perda do controle da maturação e da neurite causada durante o desenvolvimento da EAE, além das lesões causadas reduzir a sinalização e interação com os oligodendrócitos no processo de remielinização.

Os resultados obtidos indicam que a atividade de SOCS2 no SNC é extremamente importante para o estabelecimento da EAE, bem como para o processo de reconstituição e recuperação dos danos causados no SNC. Podendo abrir assim um leque de novos direcionamentos quanto ao estudo da proteína e suas vias de ativação durante a doença, bem como possíveis abordagens terapêuticas sabendo do seu papel fundamental para a resolução dos sinais clínicos durante o desenvolvimento da EAE.

8 Conclusões

Como conclusão, através dos resultados, podemos observar que SOCS2 tem um duplo papel durante as fases de desenvolvimento da doença. Onde sua expressão *in vivo* durante o desenvolvimento da doença, bem como *in vitro* nas células da glia, mostram ser importante na regulação dos processos inflamatórios da doença. Observando que a ausência da proteína durante a fase aguda está relacionada com a redução dos mecanismos inflamatórios da doença, bem como orquestrando o infiltrado de células no SNC, e a expressão de moléculas como IRF-1, importante na regulação da doença. Sendo por outro lado, que sua ausência acarreta na cronicidade da doença, impedindo a resolução e recuperação dos danos locomotores causados durante a fase aguda da doença.

9 Referências Bibliográficas

- ABAD P. *et al.* Prevalence of multiple sclerosis in Ecuador. **Neurologia**, v 25, n 5 pag 309-13, jun 2010.
- BASRAI, R.S. *et al.*, Suppressor of Cytokine Signaling-2 (SOCS2) Regulates the Microglial Response and Improves Functional Outcome after Traumatic Brain Injury in Mice. **PLoS One**. v 11, n 4, pag 1-24, apr 2016.
- BAXTER A. G. The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Nature Publishing Group**, v 7, pag 904-12, nov 2007.
- BITTNER, S. *et al.* Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (MOG₃₅₋₅₅) Induced Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 Mice. **J Vis Exp**. V 86, pag 1-5, apr 2014.
- BRANT, F. *et al.* Suppressor of cytokine signaling 2 modulates the immune response profile and development of experimental cerebral malaria. **Brain Behav Immun**, v 54, pag 73-85, may 2016.
- BROWNE, P. *et al.* Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity. **Neurology**, v 83, n 11, pag 1022–1024, sep 2014.
- BUCH, T. *et al.* A Cre-inducible diphtheria toxin receptor mediates cell lineage ablation after toxin administration. **Nature Methods**, v 2, n 6, pag 419 – 426, jun 2005.
- BUDHRAM, A., *et al.* Breaking down the gut microbiome composition in multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis Journal**, pag 1-9, dez 2016.
- CARBAJAL, K. S. *et al.* Th Cell Diversity in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Multiple Sclerosis. **J Immunol**, v 195, pag 2552-2559, aug 2015.
- CHANG, A. *et al.* Neurogenesis in the chronic lesions of multiple sclerosis. **Brain**, v 131, pag 2366-2375, sep 2008.
- CHEN J., *et al.* Multiple sclerosis patients have a distinct gut microbiota compared to healthy controls. **Scientific reports**, pag 1-10, jun 2016.
- CHEN, M.L. *et al.* Novel CD8⁺ Treg suppress EAE by TGF-beta- and IFN-gamma-dependent mechanisms. **Eur J Immunol**, v 39, n 12, pag 3421-35, dec 2009.
- CHRISTIANO E.; PATRUCCO L.; Rojas J.I. A systematic review of the epidemiology of multiple sclerosis in South America. **Eur J Neurol**, n 15, v 12, pag 1273–8, 2008.
- CONSTANTINESCU, C. S. *et al.*, Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS), **British Journal of Pharmacology**, v 164, pag 1079–1106, feb 2011.
- CORREALE J.; GAITÁN M I.; A esclerose múltipla e ambientais factores: o papel da vitamina D, parasitas, e a infecção pelo vírus Epstein-Barr. **Acta Neurol Scand**, v 132, n 199, pag 46-55, jun 2015.
- CORTHAY, A. How do Regulatory T Cells Work? **Scand J Immunol**, v 70, n 4, pag 326-336, oct 2009.
- CUI, M. *et al.* The suppressor of cytokine signaling 2 (SOCS2) inhibits tumor metastasis in hepatocellular carcinoma. **Tumour Biol**, v 37, n 10, pag 13521-13531, oct 2016.

DENDROU, C. A.; FUGGER, L.; FRIESE M. A. Immunopathology of multiple sclerosis. **Nature Reviews**, v 15, pag 545-558, sep 2015.

DINARELLO, C. A. Historical Review of Cytokines. **Eur J Immunol**, v 37, n 1, pag S34–S45, nov 2007.

DITTEL, B. N. CD4 T cells: Balancing the coming and going of autoimmune-mediated inflammation in the CNS. **Brain, Behavior, and Immunity**, v 22, pag 421–430, jan 2008.

DUFFY, S. S.; LEES, J. G.; MOALEM-TAYLOR G. The Contribution of Immune and Glial Cell Types in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Multiple Sclerosis. **Mult Scler Int**, pag 1-17, oct 2014.

ENCINAS J. A. *et al.* Identification of genetic loci associated with paralysis, inflammation and weight loss in mouse experimental autoimmune encephalomyelitis. **International Immunology**, v 13, n 3, pp. 257–264, mar 2001.

ESPER L. *et al.* Role of SOCS2 in Modulating Heart Damage and Function in a Murine Model of Acute Chagas Disease. **Am J Pathol**, v 181, n 1, pag 130–140, jul 2012.

ESPER, L. M. Função das células dendríticas durante a infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*: PAPEL DE SOCS2. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical. **Tese de doutorado**. 2016. Disponível em: < <http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/> >

FENG, Y. *et al.* Potential roles of suppressor of cytokine signaling in wound healing. **Regen. Med**, v 11, n 2, pag 193–209, fev 2016.

FINKELSZTEIN, A. Esclerose múltipla no brasil: estudo de custo da doença e de custo-efetividade dos tratamentos disponíveis no país. UFRGS – LUME Repositório Digital, **Tese de doutorado**, Porto Alegre, nov 2013.

FLETCHER J. M. *et al.*, T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. **Clinical and Experimental Immunology**, v 162, pag 1–11, jan 2010.

FRID K. Aggregation of MBP in chronic demyelination. **Annals of Clinical and Translational Neurology**, v 2, n 7, pag 711-721, mar 2015.

FRIESE, M. A.; FUGGER L. Autoreactive CD8+ T cells in multiple sclerosis: a new target for therapy? **Brain**, v 128, n 8, pag 1747-63, aug 2015.

GAJOFATTO, A.; BENEDETTI, M. D. Treatment strategies for multiple sclerosis: When to start, when to change, when to stop? **World J Clin Cases**, v 16, n 7, pag 545-555, jul 2015.

GAMA PEREIRA A. B. *et al.* Prevalence of multiple sclerosis in Brazil: A systematic review. **Mult Scler Relat Disord**, v 4, n 6, pag 572-9, nov 2015.

GAWLIK, B. B.; HAFLE, D. A. Regulatory T Cells in MS. **Multiple Sclerosis Immunology – Springer**, Chapter 2, XVII, pag 1-47, 2013.

GILLI, F. *et al.* Learning from Nature: Pregnancy Changes the Expression of Inflammation-Related Genes in Patients with Multiple Sclerosis. **PLOS One**, v 5, n 1, pag 1-11, jan 2010.

GILLI, F. *et al.* Loss of Braking Signals During Inflammation. **ARCH NEUROL**, v 68, n 7, pag 879-888, jul 2011.

GOLDEN, L. C.; VOSKUHL, R. The Importance of Studying Sex Differences in Disease: The Example of Multiple Sclerosis. **Journal of Neuroscience Research**, v 95, pag 633–643, nov 2016.

GOLDSHMIT, Y. *et al.* SOCS2 Induces Neurite Outgrowth by Regulation of Epidermal Growth Factor Receptor Activation. **The journal of biological chemistry**, v. 279, n. 16, pag 16349–16355, apr 2004.

GOLDSHMIT, Y. *et al.* Suppressor of cytokine signalling-2 and epidermal growth factor regulate neurite outgrowth of cortical neurons, v 20, n 9, pag 2260-6, nov 2004.

GOVERMAN J. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. **Nat Rev Immunol**, v 9, n 6, pag 393-407, jun 2009.

GOVERMAN, J.; PERCHELLET, A.; HUSEBY, E. S. The role of CD8(+) T cells in multiple sclerosis and its animal models. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**, v 4, n 2, pag 239-45, apr 2005.

GRIGORIADISA, N; PESCHB V.; VAN. A basic overview of multiple sclerosis immunopathology. **European Journal of Neurology**, vol. 22, n S2, pag 3-13, oct 2015.

GUERRERO-GARCÍA *et al.* Multiple Sclerosis and Obesity: Possible Roles of Adipokines. **Mediadores Inflamm**, pg 1-24, sep 2016.

Hammond S.R., *et al.* The epidemiology of multiple sclerosis in three Australian cities: Perth, Newcastle and Hobart. **Brain**, v 111, n 1, pag 1-25, feb 1988.

HAUSER S. L.; CHAN J.R.; OKSENBERG J.R. Multiple sclerosis: prospects and promise. **Ann Neurol**, v 74, n 3, pag 317–327, sep 2013.

HOEFER, J. *et al.* SOCS2 correlates with malignancy and exerts growth-promoting effects in prostate cancer. **Endocr Relat Cancer**, v 21, n 2, pag 175-87, jan 2014.

HORVAT, S.; MEDRANO, J. S. Lack of Socs2 expression causes the high-growth phenotype in mice. **Genomics**, 2001 Mar 1;72(2):209-12.

ISOMÄKI, P. *et al.* The expression of SOCS is altered in rheumatoid arthritis. **Rheumatology (Oxford)**, v 46, n 10, pag 1538-46, oct 2007.

KARWACZ K.; YOSEF N.; KUCHROO V. IRF-1 is a key transcriptional regulator of Tr1 differentiation (P1135). **J Immunol**, v 190, n 1, may 2013.

KNOSP, C. A. *et al.* Regulation of Foxp3+ Inducible Regulatory T Cell Stability by SOCS2. **J Immunol**, v 190, pag 3235-3245, mar 2013.

KNOSP, C. A.; JOHNSTON, J. A. Regulation of CD4⁺ T-cell polarization by suppressor of cytokine signalling proteins. **Immunology**, v 135, n 2, pag 101-111, feb 2012.

KOCH-HENRIKSEN, N.; Sorensen P.S. 2010. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. **Lancet Neurol**, n 9, v 5, pag 520–532, may 2010.

KOUTROLOS, M. *et al.* Treg cells mediate recovery from EAE by controlling effector T cell proliferation and motility in the CNS. **Acta Neuropathol Commun**, v 2, n 163, pag 1-7. dec 2014.

KROENKE, M. A. *et al.*, IL-12– and IL-23–modulated T cells induce distinct types of EAE based on histology, CNS chemokine profile, and response to cytokine inhibition. **J Exp Med**, v 205, n 7, pag 1535-1541, jul 2008.

KRUGLOV, A. A. Pathogenic and Protective Functions of TNF in Neuroinflammation Are Defined by Its Expression in T Lymphocytes and Myeloid Cells. **J Immunol**, v 187, n 11, dec 2011.

KUMAR, David R. *et al.* Jean-Martin Charcot: The Father of Neurology. **Clinical Medicine & Research**, vol 9, n 1, p. 46-49, mar 2011.

KURNELLAS, M. P.; DONAHUE, K. C.; ELKABES, S. Mechanisms of neuronal damage in multiple sclerosis and its animal models: role of calcium pumps and exchangers. **Biochem Soc Trans**, v 35, n 5, pag 923-926, nov 2007.

LANDER R., *et al.* Plasmacytoid dendritic cells in multiple sclerosis: intracerebral recruitment and impaired maturation in response to interferon-beta. **J Neuropathol Exp Neurol**, v 67, n 59, pag 388–401, may 2008.

LARSEN, L., ROPKE C. Suppressors of cytokine signalling: SOCS. **APMIS**, v 110, n 12, pag 833-44, dec 2002.

LASSMANN, H. Axonal and neuronal pathology in multiple sclerosis: what have we learnt from animal models. **Exp Neurol**, v 225, n 1, pag 2-8, oct 2009.

LEGROUX L.; ARBOUR N. Multiple Sclerosis and T Lymphocytes: An Entangled Story. **J Neuroimmune Pharmacol**, v 10, n 4, pag 528–546, dec 2015.

LEGROUX, L.; ARBOUR, N. Multiple Sclerosis and T Lymphocytes: An Entangled Story. **J Neuroimmune Pharmacol**, v 10, n 4, pag 528-546, dec 2015.

LETELLIER *et al.*, Identification of SOCS2 and SOCS6 as biomarkers in human colorectal cancer. **British Journal of Cancer**, v 111, pag 726–735, jul 2014.

LETELLIER, E.; HAAN, S.; SOCS2: physiological and pathological functions. **Frontiers in Bioscience**, v 8, pag 189-204, jan 2016.

LODA E.; BALABANOV R. Interferon regulatory factor 1 regulation of oligodendrocyte injury and inflammatory demyelination. **Rev Neurosci**, v 23, n 2, pag 145-52, jan 2012.

LONGHINI A. L., *et al.* Plasmacytoid dendritic cells are increased in cerebrospinal fluid of untreated patients during multiple sclerosis relapse. **J Neuroinflammation**, v 8, n 2, pag 1-4, jan 2011.

LUBLIN F. D. *et al.* Defining the clinical course of multiple sclerosis. **American Academy of Neurology**, v 83, pag 278-86, jul 2014.

LUBLIN, F. History of modern multiple sclerosis therapy. **J Neurol**, v 252, n 3, pag 3-9, sep 2005.

MACHADO, F. S. *et al.* Anti-inflammatory actions of lipoxin A4 and aspirin-triggered lipoxin are SOCS-2 dependent. **Nat Med**, v 12, n 3, pag 330-4, mar 2006.

MAKHANI, N. *et al.* MS incidence and prevalence in Africa, Asia, Australia and New Zealand: A systematic review. **Multiple Sclerosis and related disorders**, v 3, n 1, pag 48–60, jan 2014.

Mayo L.; QUINTANA F. J.; WEINER H. L. The Innate Immune System in Demyelinating Disease. **Immunol Rev**, v. 248, n 1, pag 170–187, jul 2012.

MBONGUE, J. *et al.* The Role of Dendritic Cells in Tissue-Specific Autoimmunity. **Journal of Immunology Research**, pag 1-17, apr 2014.

MCGEACHY, M. J.; STEPHENS, L. A.; ANDERTON, S. M. Natural Recovery and Protection from Autoimmune Encephalomyelitis: Contribution of CD4⁺CD25⁺Regulatory Cells within the Central Nervous System. **J Immunol**, v 175, n 5, pag 3025-3032, sep 2005.

METCALF, D. *et al.* Gigantism in mice lacking suppressor of cytokine signalling-2. **J Clin Invest**, v 115, n 2, pag 397-406, feb 2005.

MILLER, S. D.; KARPUS W. J.; DAVIDSON T. D. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in the Mouse. **Curr Protoc Immunol**, v 15, n 1, pag 1-26, may 2007.

MILO, R., MILLER A. Revised diagnostic criteria of multiple sclerosis. **Autoimmunity Reviews**, v 13, pag 518–524, jan 2014.

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – **CONCEA**. Diretriz Brasileira para o cuidado e a utilização de animais em atividades de ensino ou de pesquisa científica – DBCA Brasília/DF – 2016.

MIX E. *et al.* Animal models of multiple sclerosis—Potentials and limitations. **Progress in Neurobiology**, v 92, pag 386–404, jun 2010.

OLSSON, T.; BARCELLOS, L F.; ALFREDSSON, L. Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. **Nature Reviews Neurology**, n 13, pag 25–36, dec 2016.

ORENGO, L. C. *et al.* Enhanced sphingosine-1-phosphate receptor 2 expression underlies female CNS autoimmunity susceptibility. **The Journal of Clinical Investigation**, v 124, n 6, pag 2571-84, jun 2014.

PETERSON, J. W. *et al.* Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions. **Ann Neurol**, v 50, n 3, pag 389-400, sep 2001.

POLIZZOTTO, M. N.; BARTLETT, P. F.; TURNLEY, A. M. Expression of “suppressor of cytokine signalling” (SOCS) genes in the developing and adult mouse nervous system. **The Journal of Comparative Neurology**, v 423, n 2, pag 348-358, jul 2000.

POSSELT, G. *et al.* Suppressor of Cytokine Signaling 2 Is a Feedback Inhibitor of TLR-Induced Activation in Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. **J Immunol**, v 187, n 6, pag 2875-2884, sep 2011.

PRINZ J. *et al.* Time-Dependent Progression of Demyelination and Axonal Pathology in MP4-Induced Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **PLoS One**, v 10, n 12, pag 1-14, dez 2015.

PROBERT, L. *et al.* Spontaneous inflammatory demyelinating disease in transgenic mice showing central nervous system-specific expression of tumor necrosis factor alpha. **Proc Natl Acad Sci**, v 92, pag 11294-8, nov 1995.

PROCACCINI, C. *et al.*. Animal models of Multiple Sclerosis. **European Journal of Pharmacology**, v 759, n 15, pag 182–191, jul 2015.

QIN, H. *et al.* IFN- β -induced SOCS-1 negatively regulates CD40 gene expression in macrophages and microglia. **FASEB J**, v 20, n 7, pag 985-7, may 2006.

QIN, Hongwei *et al.* IL-10 Inhibits Lipopolysaccharide-Induced CD40 Gene Expression through Induction of Suppressor of Cytokine Signaling-3. **J Immunol**, v 177, pag 7761-7771, jan 2006.

QUINTANA, F. J.; YESTE, A.; MASCANFRONI, I. D. Role and therapeutic value of dendritic cells in central nervous system autoimmunity. **Cell Death and Differentiation**, v 22, pag 215–224, fev 2015.

RAMAGOPALAN, S; SADOVNICK D. Epidemiology of Multiple Sclerosis. **Neurol Clin**, v 29, pag 207–217, may 2011.

RANSOHOFF R. M.; KIVISAKK, P.; KIDD G. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. **Nature Reviews Immunology**, v 3, pag 569-581, jul 2003.

RANSOME, M. I.; TURNLEY, A. M. Analysis of neuronal subpopulations in mice over-expressing suppressor of cytokine signaling-2. **Neuroscience**, v 132, n 3, pag 673-87, 2005.

RANSOME, M.I., TURNEY, A.M. Growth hormone signaling and hippocampal neurogenesis: insights from genetic models. **Hippocampus**, v 18, n 10, pag 1034-50, 2008.

REN, Z. *et al.* IRF-1 signaling in central nervous system glial cells regulates inflammatory demyelination. **J Neuroimmunol**, v 233, n 1-2, pag 147–159, apr 2011.

REN, Z. *et al.* Overexpression of the Dominant-Negative Form of Interferon Regulatory Factor 1 in Oligodendrocytes Protects against Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **J Neurosci**, v 31, n 23, pag 8329-41, jun 2011.

RICO-BAUTISTA, E.; FLORES-MORALES, A.; FERNANDÉZ-PÉREZ, L. Suppressor of cytokine signaling (SOCS) 2, a protein with multiple functions. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v 17, pag 431–439, out 2006.

RIVERS T.M.; SCHWENTKER F.F. ENCEPHALOMYELITIS ACCOMPANIED BY MYELIN DESTRUCTION EXPERIMENTALLY PRODUCED IN MONKEYS. **J Exp Med**, v 61, n 5, pag 689-702, apr 1935.

RODRÍGUEZ, M. Effectors of demyelination and remyelination in the CNS: implications for multiple sclerosis. **Brain Pathol**, v 17, n 2, pag 219–229, mar 2007.

ROSTAMI, A.; CIRIC B. Role of Th17 cells in the pathogenesis of CNS inflammatory demyelination. **J Neurol Sci**, v 333, n 1-2, pag 76-87, oct 2013.

SALOU, M. *et al.* Involvement of CD8(+) T Cells in Multiple Sclerosis. **Front Immunol**, v 6, n 604, pag 1-9, nov 2015.

SCHWENTKER F.F.; RIVERS T. M. The antibody response of rabbits to injections of emulsions and extracts of homologous brain. **J Exp Med**, v 60, n 5, pag 559-574, oct 1934.

SHEMER, A.; JUNG S. Differential roles of resident microglia and infiltrating monocytes in murine CNS autoimmunity. **Semin Immunopathol**, v 37, n 6, pag 613–623, nov 2015.

SIMONS, M.; TRAJKOVIC K. Neuron-glia communication in the control of oligodendrocyte function and myelin biogenesis. **Journal of Cell Science**, v 119, 4381-4389. Sep 2006.

SINGHAL, M.; SRIVASTAVA P. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Model for Discovery of New Therapy for Multiple Sclerosis. **Global Journal of Pharmacology**, v 6, n 3, pag 208-215, 2012.

SINHA, S.; ITANI, F.R.; KARANDIKAR, N. J. Immune regulation of multiple sclerosis by CD8+ T cells. **Immunol Res**, v 59, n 1-3, pag 254-65, aug 2014.

SMITH, M. E. Phagocytosis of myelin by microglia in vitro. **J Neurosci Res**, v 32, n 3, pag 384-94, jul 1992.

SMITH, M. E.; HOERNER, M. T. Astrocytes modulate macrophage phagocytosis of myelin in vitro. **Journal of Neuroimmunology**, v 102, n 2, pag 154-162, jan 2000.

Sommer M.A.; Forno L.S.; Smith M.E. EAE cerebrospinal fluid augments in vitro phagocytosis and metabolism of CNS myelin by macrophages. **J Neurosci Res**, v 32, n 3, pag 384-94, jul 1992.

STARR, R. *et al.* A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. **Nature**, v 387, n 6636, pag 917-21, jun 1997.

STEINMAN, L. Myelin-Specific Cd8 T Cells in the Pathogenesis of Experimental Allergic Encephalitis and Multiple Sclerosis. **J Exp Med**, v 194, n 5, pag 27-30, sep 2001.

TERRY, R. L.; IFERGAN I.; MILLER S. D. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Mice. **Methods Mol Biol**, v 1304, pag 145–160, jan 2016.

TORKILDSENA; Ø. MYHRA, K. M.; BØA L. Disease-modifying treatments for multiple sclerosis – a review of approved medications. **Eur J Neurol**, v 23, n 1, pag 18-27, jan 2016.

TSAO, J.T.; KUO, C.C.; LIN, S.C. The analysis of CIS, SOCS1, SOCS2 and SOCS3 transcript levels in peripheral blood mononuclear cells of systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients. **Clin. Exp. Med**, v 8, n 4, pag 179–185, dec 2008.

UREN, R. T.; TURNLEY, A. M. Regulation of neurotrophin receptor (Trk) signaling: suppressor of cytokine signaling 2 (SOCS2) is a new player. **Front Mol Neurosci**, v 14, n 7, pag 1-14, may 2014.

VAKNIN-DEMBINSKY A. *et al.* Increased IL-23 secretion and altered chemokine production by dendritic cells upon CD46 activation in patients with multiple sclerosis. **J Neuroimmunol**, v 195, n 1-2, pag 140–145, mar 2008.

VENKEN, K. *et al.* Compromised CD4+ CD25(high) regulatory T-cell function in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is correlated with a reduced frequency of FOXP3-positive cells and reduced FOXP3 expression at the single-cell level. **Immunology**, v 123, n 1, pag 79-89, sep 2008.

VENKEN, K. *et al.* Secondary progressive in contrast to relapsing-remitting multiple sclerosis patients show a normal CD4+CD25+ regulatory T-cell function and FOXP3 expression. **J Neurosci Res**, v 83, n 8, pag 1432-46, jun 2006.

WILLIAMS, K. *et al.* Activation of Adult Human Derived Microglia by Myelin Phagocytosis In Vitro. **Journal of Neuroscience Research**, n 38, pag 433-443, jul 1994.

WOLF A.; KABAT E.A.; BEZER A.E. The pathology of acute disseminated encephalomyelitis produce experimentally in the rhesus monkey and its resemblance to human demyelinating disease. **J Neuropathol Exp Neurol**, v 6, n 4, pag 333-57, oct 1947.

ZOZULYA, A. L.; WIENDL, H. The role of regulatory T cells in multiple sclerosis. **Nature Clinical Practice Neurology**, v 4, pag 384-398, dec 2008.