

**ADRIANA CARVALHO DOS SANTOS**

**Estudo *in vivo* do papel das quimiocinas e dos receptores  
de bradicinina, B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, no recrutamento de leucócitos na  
microvasculatura cerebral de camundongos com  
Encefalomielite Autoimune Experimental**

Orientador:

Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira

Depto. de Bioquímica e Imunologia

Co-orientadora:

Profa. Dra. Juliana Carvalho Tavares

Depto. Fisiologia e Biofísica

**Estudo *in vivo* do papel das quimiocinas e dos receptores  
de bradicinina, B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, no recrutamento de leucócitos na  
microvasculatura cerebral de camundongos com  
Encefalomielite Autoimune Experimental**

**ADRIANA CARVALHO DOS SANTOS**

**Banca Examinadora:**

Mauro Martins Teixeira – Departamento de Bioquímica e Imunologia, UFMG

André Ricardo Massensini – Departamento de Fisiologia, UFMG

Denise Carmona Cara Machado – Departamento de Patologia, UFMG

Regina Pekeimann Markus – Departamento de Fisiologia, USP/SP

Moisés Evandro Bauer – Departamento de Imunologia Molecular e Celular, PUC/RS

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais para a obtenção do título de doutor em Farmacologia.**

**Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunofarmacologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia e no Laboratório de Neuro-Imunofisiologia do Departamento de Fisiologia e Biofísica. Apoio financeiro: CNPq e FAPEMIG.**

**Dedico esta tese aos meus pais pela constante dedicação e carinho, e ao meu novo e eterno amor Francisco.**

**“Os dias prósperos não vêm por acaso,  
nascem de muita fadiga e persistência.”**

**Henry Ford**

## **Agradecimentos**

À professora Juliana Carvalho Tavares pela dedicação oferecida desde o início a este trabalho e por ser, além de co-orientadora, uma amiga.

Ao professor Mauro Martins Teixeira pela confiança, amizade e intensa colaboração para o desenvolvimento desta tese.

Às professoras Rosa Arantes e Conceição Machado pela importante colaboração com as análises histopatológicas.

Ao professor Márcio Moraes por ter, gentilmente, permitido o uso de seu laboratório para a realização das cirurgias de craniotomia.

Ao professor Antônio Lúcio Teixeira pela atenção e colaboração durante o desenvolvimento desta tese.

À amiga Norinne por me ajudar em boa parte dos experimentos e pelo seu carinho tão sincero.

À Michele Barsante pela grande ajuda durante o desenvolvimento do modelo experimental.

Àos meus amigos Éster Roffê, Lucíola, Angélica, Letícia, Valdinéia, Flávio Lopes, Landa e Caroline pelo carinho e amizade.

A todos os colegas do laboratório de Imunofarmacologia pela ajuda nos experimentos, pelas sugestões e carinho.

Aos colegas da PG Fisiologia e Farmacologia minha gratidão

Ao meu marido Dan Roussel pelo incentivo e amor.

Aos meus pais, a minha irmã e a toda minha família.

À DEUS por estar sempre entre nós.

## Lista de abreviaturas

- ❖ AMPc: monofosfato cíclico de adenosina
- ❖ BHE: barreira hematoencefálica
- ❖ B1: receptor 1 de bradicinina
- ❖ B2: receptor 2 de bradicinina
- ❖ BK: bradicinina
- ❖ BSA: albumina de soro bovino
- ❖ CCL2/MCP-1: proteína quimioatraente de macrófagos e monócitos
- ❖ CCL3/MIP1 $\alpha$ : proteína quimioatraente de macrófagos, monócitos e linfócitos CD8+
- ❖ CCL5/RANTES: proteína secretada e regulada pela ativação de linfócitos T/ quimioatraente de linfócitos T ativados e eosinófilos
- ❖ CXCL8/IL-8: proteína quimioatraente de neutrófilo
- ❖ CXCL10/IP-10: proteína induzida por interferon 10
- ❖ CCR: receptor de quimiocinas
- ❖ CFA: Adjuvante completo de Freud
- ❖ FCE: fluido cerebrospinal
- ❖ DAG: diacilglicerol
- ❖ DNA: ácido desoxirribonucléico
- ❖ ECM: matriz extracelular
- ❖ EAE: encefalomielite autoimune experimental
- ❖ ECA: enzima conversora da angiotensina

- ❖ ELISA: ensaio imunoenzimático
- ❖ EM: esclerose múltipla
- ❖ GAG: glicosaminoglicano
- ❖ GFAP: proteína glial fibrilar acídica de astrócito
- ❖ H&E: hematoxilina e eosina
- ❖ HPRT: hypoxantina fosforibosil transferase
- ❖ ICAM: molécula de adesão intercelular
- ❖ IFN: interferon
- ❖ Ig( ): imunoglobulina
- ❖ IL-( ): interleucina
- ❖ i.p.: intraperitoneal
- ❖ kDa: quilo Dalton
- ❖ MAG: glicoproteína associada à mielina
- ❖ MAP: proteína quinase ativada por mitógeno
- ❖ MBP: proteína básica da mielina
- ❖ MMP: metaloproteinase de matriz
- ❖ MOG: glicoproteína associada a oligodendrócito
- ❖ PBS: tampão fosfato de sódio
- ❖ PLA, C,D: fosfolipase A, C, D
- ❖ PKC: proteína quinase C
- ❖ PLP: proteolípídeo da mielina
- ❖ RM: ressonância magnética
- ❖ RNA: ácido ribonucléico
- ❖ RT-PCR: reação de polimerização em cadeia – transcriptase reversa

- ❖ s.c.: subcutânea
- ❖ SNC: sistema nervoso central
- ❖ SNP: sistema nervoso periférico
- ❖ TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral  $\alpha$
- ❖ VCAM: molécula de adesão de células vasculares
- ❖ VLA: antígeno de ativação tardia

## Lista de figuras e tabelas

<b>Figura 1:</b> Composição da bainha de mielina.....	7
<b>Figura 2:</b> Estrutura primária da molécula murina de MOG e suas seqüências indutoras.....	10
<b>Figura 3:</b> Mecanismo de recrutamento de leucócitos através do endotélio.....	13
<b>Figura 4:</b> Classificação dos grupos de quimiocinas.....	17
<b>Figura 5:</b> Relação de interação entre quimiocinas e seus receptores.....	18
<b>Figura 6:</b> Estrutura das glicosaminoglicanas e proteoglicanos.....	21
<b>Figura 7:</b> Sistema de interação quimiocinas-GAGs durante a migração de leucócitos.....	25
<b>Figura 8:</b> Sistema cinina-caliceína e receptores.....	29
<b>Figura 9:</b> Hipótese da patogenia da Esclerose Múltipla e do modelo de EAE.....	30
<b>Figura 10:</b> Protocolo de indução do modelo murino de EAE .....	38
<b>Figura 11:</b> Região perivascular das meninges.....	41
<b>Figura 12.</b> Avaliação do desenvolvimento clínico do modelo murino de EAE induzido por MOG <sub>35-55</sub> .....	53
<b>Figura 13.</b> Análise histopatológica do cérebro de animais com EAE.....	54
<b>Figura 14.</b> Análise <i>in vivo</i> do recrutamento de leucócitos na microvasculatura cerebral de camundongo com EAE.....	56
<b>Figura 15.</b> Avaliação da produção de citocinas e quimiocinas no cérebro de camundongos com EAE.....	59

<b>Figura 16.</b> Análise <i>in vivo</i> do efeito do tratamento anti-CCL2 e anti-CCL5 no recrutamento de leucócitos na microvasculatura cerebral de camundongos com EAE.....	60
<b>Figura 17.</b> Efeito da proteína mutante P8A sobre o desenvolvimento clínico do modelo murino de EAE.....	63
<b>Figura 18.</b> Avaliação de diferentes tratamentos com a proteína mutante P8A em camundongos com EAE.....	64
<b>Figura 19.</b> Avaliação do perfil clínico após tratamento com a quimiocina CCL2 e sua proteína modificada P8A no modelo murino de EAE.....	65
<b>Figura 20.</b> Efeito da proteína mutante P8A sobre o recrutamento de leucócitos na microvasculatura cerebral de animais com EAE.....	67
<b>Figura 21.</b> Avaliação <i>in vivo</i> do recrutamento de leucócitos na microvasculatura cerebral de camundongos com EAE a partir do tratamento com CCL2/MCP-1 e P8A.....	68
<b>Figura 22.</b> Efeito da proteína mutante P8A na produção de citocinas e quimiocinas no modelo murino de EAE.....	70
<b>Figura 23.</b> Avaliação do perfil clínico do modelo de EAE em animais knockout para os receptores B <sub>1</sub> e B <sub>2</sub> da bradicinina.....	74
<b>Figura 24.</b> Análise histopatológica no cérebro, cerebelo e medula espinhal de animais knockout para os receptores B <sub>1</sub> e B <sub>2</sub> da bradicinina com EAE.....	75
<b>Figura 25.</b> Análise <i>in vivo</i> do recrutamento de leucócitos na microvasculatura cerebral de animais knockout para os receptores B <sub>1</sub> e B <sub>2</sub> da bradicinina.....	77
<b>Figura 26.</b> Avaliação da expressão do receptor B <sub>1</sub> no extrato cerebral de camundongos com EAE.....	79

<b>Figura 27.</b> Avaliação do papel dos receptores B <sub>1</sub> e B <sub>2</sub> da bradicinina na regulação da produção de citocinas e quimiocinas no modelo EAE.....	82
<b>Tabela 1:</b> Seqüências indutoras do modelo de EAE.....	8
<b>Tabela 2:</b> Escala de severidade clínica do modelo murino de EAE.....	39

## Sumário

1. Introdução.....	2
1.1. Esclerose Múltipla.....	2
1.2. Encefalomielite Autoimune Experimental, modelo animal da EM.....	4
1.3. Recrutamento de leucócitos para o Sistema Nervoso Central.....	11
1.4. Participação das quimiocinas no modelo de EAE.....	14
1.5. Sistema cinina-calicreínas e possível papel no modelo de EAE.....	25
2. Objetivo geral.....	32
2.1. Objetivos específicos.....	32
3. Material e Métodos.....	35
3.1. Animais.....	35
3.2. Reagentes e Anticorpos.....	35
3.3. Indução do modelo de EAE em camundongos.....	36
3.4. Avaliação do desenvolvimento clínico da EAE.....	37
3.5. Microscopia Intravital na microvasculatura cerebral.....	38
3.6. Avaliação <i>in vivo</i> do recrutamento de leucócitos após tratamento com anticorpos anti-CCL2 e anti-CCL5.....	41
3.7. Tratamento com a quimiocina CCL2 e sua proteína mutante P8A.....	41
3.8. Preparo do extrato de cérebro.....	43
3.9. Ensaio imunoenzimático (ELISA) para medida dos níveis de citocinas e quimiocinas no extrato de cérebro.....	43
3.10. Ensaio de mieloperoxidase (MPO).....	44
3.11. Transcriptase Reversa – Reação de Polimerização em Cadeia (RT-PCR).....	45
3.12. Análise histopatológica.....	47
3.13. Análise estatística.....	47
4. Resultados.....	48

4.1.	Avaliação do desenvolvimento clínico e inflamatório do modelo murino de EAE induzido por MOG <sub>35-55</sub> .....	51
4.1.1.	Avaliação clínica e histopatológica.....	51
4.1.2.	Avaliação do recrutamento de leucócitos na microvasculatura Cerebral.....	55
4.1.3.	Participação das quimiocinas no recrutamento de leucócitos durante a EAE.....	57
4.2.	Avaliação da quimiocina CCL2 na EAE a partir do tratamento com a sua proteína mutante P8A.....	61
4.2.1.	Avaliação do perfil clínico após o tratamento com P8A.....	61
4.2.2.	Recrutamento de leucócitos na microvasculatura cerebral após tratamento com P8A.....	66
4.2.3.	Perfil de citocinas e quimiocinas a partir do tratamento com P8A.....	69
4.3.	Papel dos receptores de bradicinina B <sub>1</sub> e B <sub>2</sub> na EAE.....	72
4.3.1.	Avaliação clínica do modelo de EAE em animais knockout para os receptores B <sub>1</sub> e B <sub>2</sub> .....	72
4.3.2.	Análise histopatológica.....	72
4.3.3.	Papel dos receptores B <sub>1</sub> e B <sub>2</sub> nos eventos de rolamento e adesão de leucócitos na microvasculatura cerebral.....	76
4.3.4.	Expressão de RNAm para o receptor B <sub>1</sub> da bradicinina no extrato de cérebro.....	78
4.3.5.	Papel dos receptores B <sub>1</sub> e B <sub>2</sub> na produção de citocinas e quimiocinas no extrato de cérebro.....	80
5.	Discussão.....	84
6.	Considerações finais.....	97
7.	Referências bibliográficas.....	100
	Anexos.....	124

## Resumo

A Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE), modelo animal da Esclerose Múltipla (EM), é caracterizada como uma doença inflamatória crônica, com um intenso influxo de células mononucleares para o sistema nervoso central (SNC). Vários estudos têm demonstrado uma participação das quimiocinas durante a EAE, mas ainda não foi esclarecido como esses mediadores regulam o recrutamento de leucócitos para o SNC. Após a indução da EAE com MOG<sub>35-55</sub>, o recrutamento de leucócitos foi marcante no dia 14 após a indução, com um aumento dos eventos de rolamento e adesão, correlacionando com o pico de manifestação clínica e inflamação, assim como um aumento da produção de TNF $\alpha$ , CCL2 e CCL5. Nenhuma diferença foi observada quanto aos níveis de CCL3 e CXCL10. O tratamento com anticorpos anti-CCL2 e anti-CCL5 2h antes da microscopia intravital foi capaz de promover uma diminuição no processo de adesão, sem alterar o rolamento. Para confirmar o papel da quimiocina CCL2 no recrutamento de leucócitos, foram realizados diferentes tratamentos com a proteína mutante P8A, descrita como inibidora da atividade da CCL2. A proteína P8A foi capaz de diminuir a adesão de leucócitos e exibir um quadro clínico menos grave. Esses dados sugerem que a indução da adesão de leucócitos na microvasculatura cerebral é um evento importante na patogenia da EAE e que as quimiocinas CCL2 e CCL5 podem modular este processo. Depois foi investigado o papel das cininas no recrutamento de leucócitos para o SNC no mesmo modelo. As cininas são mediadores relevantes da inflamação e atuam através de dois

receptores específicos acoplados à proteína G, B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>. Para este estudo foram utilizados animais WT, B<sub>1</sub><sup>-/-</sup> e B<sub>2</sub><sup>-/-</sup>. A incidência da doença foi similar entre os grupos, mas os animais B<sub>2</sub><sup>-/-</sup> exibiram menor gravidade da doença. No dia 14<sup>o</sup> após a indução, houve uma diminuição do número de leucócitos aderidos nos animais knockout quando comparados com animais WT. Além disso, animais com EAE demonstraram um aumento da expressão de receptores B<sub>1</sub> no extrato de cérebro, parcialmente diminuídos nos animais B<sub>2</sub><sup>-/-</sup>. A produção de CCL5 foi diminuída nos animais B<sub>1</sub><sup>-/-</sup> e B<sub>2</sub><sup>-/-</sup>, mas CCL2 apenas foi diminuída nos animais B<sub>2</sub><sup>-/-</sup>. Contudo, esses resultados sugerem que receptores B<sub>2</sub> possuem um importante papel no controle da doença, via regulação da expressão de B<sub>1</sub>, modulação da quimiocina CCL2 e, conseqüente, controle da adesão de leucócitos. Logo, o bloqueio da atividade da quimiocina CCL2 pelo uso da P8A ou por antagonistas de BK pode representar uma importante estratégia para suprimir o influxo de leucócitos para o SNC e, conseqüentemente, controlar a gravidade da doença.

## **Abstract**

Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) models multiple sclerosis (MS) and is characterized by marked mononuclear cell influx in the brain. Inflammation leads to demyelinating lesions and disease. Several studies have demonstrated a role for chemokines during EAE. It remains to be determined whether these mediators modulate EAE primarily by mediating leukocyte influx into the CNS or by modifying lymphocyte activation and/or trafficking into lymphoid organs. After induction of EAE with MOG<sub>35-55</sub>, leukocyte recruitment peaked on day 14 and correlated with symptom onset, TNF- $\alpha$  production and production of CCL2 and CCL5. Levels of CXCL-10 and CCL3 were not different from control animals. We demonstrated that leukocyte rolling and adhesion also peaked at day 14. The treatment with anti-CCL2 or anti-CCL5 antibodies just prior to the intravital microscopy prevented leukocyte adhesion, but not rolling. To confirm the role of CCL2 on leukocyte recruitment, we performed different treatments with the mutant protein P8A, described as an inhibitor of CCL2 activity. P8A was able to decrease leukocyte adhesion and ameliorated the clinical course of disease. Our data suggest that induction of leukocyte adhesion to the brain microvasculature is an important mechanism by which CCL2 and CCL5 participate in the pathogenesis of EAE. Next, we investigated the role of kinins in driving EAE and chemokine production in the brain. The kinins are relevant mediators of inflammation and act through stimulation of two receptor subtypes, B1 and B2. For the present study B1-deficient (B1<sup>-/-</sup>), B2-deficient (B2<sup>-/-</sup>) and wild type (WT) mice were used. The incidence of disease was similar in the groups, but the disease in B2<sup>-/-</sup> mice was

less severe. At day 14 after EAE induction, there was a significant decrease in the number of adherent leukocytes when compared with WT mice. EAE induced an increase of B1 mRNA in brain tissue and this was partially prevented in B2<sup>-/-</sup> mice. Expression of CCL5 was suppressed in both B<sub>1</sub><sup>-/-</sup> and B<sub>2</sub><sup>-/-</sup> mice, but CCL2 expression was only inhibited in B2<sup>-/-</sup> mice. Altogether, our results suggest that B2 receptors have two major effects in the control of EAE severity: B2 regulates the expression of chemokines, including CCL2 and CCL5, the expression of B1 receptors, and B1-dependent leukocyte influx. Blockade of chemokine action (eg. by using P8A) or production (eg. by using bradykinin antagonists) may represent a valid strategy to prevent leukocyte influx into the brain and disease severity in patients with MS.

# INTRODUÇÃO

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. ESCLEROSE MÚLTIPLA

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença inflamatória crônica do sistema nervoso central (SNC), caracterizada pela destruição da bainha de mielina, perda de oligodendrócitos, gliose e lesão axonal. As lesões aparecem como placas desmielinizantes na substância branca (Al-Omaishi *et al.*, 1999). A doença afeta, principalmente, jovens adultos na faixa etária compreendida entre 25 e 30 anos e mulheres, sendo considerada rara na puberdade e depois dos 50 anos de idade (Al-Omaishi *et al.*, 1999; Richards *et al.*, 2002).

A EM foi descrita pela primeira vez em 1869 por Jean-Martin Charcot, quem reconheceu a natureza neurológica da doença. Em 1878, Luis Ranvier descobriu a mielina, um revestimento multilamelar glicoproteico que envolve o axônio no SNC por projeções de oligodendrócitos e no SNP pelas células de Schwann, e descreveu sua importância no mecanismo de transmissão de sinal do tipo saltatória ao longo dos neurônios (Waxman & Ritchie, 1985; Wingerchuk *et al.*, 2001). O processo de desmielinização produz uma alteração na condução saltatória das vias mielinizadas normais, determinando uma redução da densidade dos canais de sódio internodais com 5 a 10% de inibição na propagação do impulso nervoso. (Scolding & Franklin, 1998).

A EM se manifesta por uma série de surtos alternados por períodos de remissão parcial ou completa, freqüentemente seguidos por uma fase de progressão crônica (Raine & Cross, 1989; Wingerchuk *et al.*, 2001). As lesões variam de tamanho, com placas de desmielinização ocorrendo preferencialmente no nervo óptico, regiões periventriculares, pedúnculos cerebelares e medula espinhal. O comprometimento de uma região específica pode levar a sintomas, como fraqueza muscular, perda sensorial, parestesias e distúrbios vegetativos, extrapiramidais e mentais (Poser *et al.*, 1983; Richards *et al.*, 2002).

As principais formas clínicas incluem: surto-remissiva (SR), secundariamente progressiva (SP) e primariamente progressiva (PP). Na forma SR os pacientes apresentam um curso caracterizado por sucessivos episódios de disfunção neurológica, podendo deixar seqüelas funcionais, seguidos por fases de remissão clínica. Um percentual elevado desses pacientes pode evoluir para a forma SP, com o progressivo acúmulo de alterações neurológicas. Na forma PP, a doença evolui desde o início, de maneira lenta e progressiva, com o acúmulo de sintomas neurológicos (Al-Omaishi *et al.*, 1999). O diagnóstico é primariamente clínico, sendo complementado através da ressonância magnética (RM) e pesquisa de bandas oligoclonais de IgG no líquido cerebrospinal (FCE).

A Esclerose Múltipla tem sido descrita como uma doença autoimune, na qual células T CD4+ reconhecem componentes da bainha de mielina, como a glicoproteína associada à mielina (MAG), proteína básica da mielina (MBP), proteolípido (PLP) e a glicoproteína associada à oligodendrócitos (MOG) (Figura 1). No entanto, sua etiologia é considerada multifatorial, em que fatores ambientais e genéticos podem ser responsáveis pela patogenia da doença (Noseworthy, 1999).

Entretanto, tem sido sugerido que a etapa inicial de um processo inflamatório no SNC consiste na migração de células T ativadas através da barreira hematoencefálica (BHE), levando a uma amplificação da resposta imune através de diferentes mediadores inflamatórios, como citocinas, peptídeos vasoativos e outras neurotoxinas, liberados por células ativadas do sistema imune e por células residentes do SNC, como a microglia (Martino *et al.*, 2000; Kornek & Lassmann, 2003). E o infiltrado inflamatório observado nas lesões EM constitui principalmente de linfócitos T, B e macrófagos (Matute & Pérez-Cerdá, 2005).

## **1.2. ENCEFALOMIELITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL, MODELO ANIMAL DA EM**

A primeira demonstração de um modelo de resposta autoimune em mamíferos, a partir da imunização com mielina do SNC, ocorreu em 1933 por Thomas Rivers através de repetidas injeções de extrato de cérebro e medula espinhal de coelho em mamíferos. A partir daí foi definido o modelo de Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE) (Antel & Owens, 1999). Contudo, a EAE tem sido caracterizada por uma resposta inflamatória do SNC mediada por células T CD4+.

Há anos o modelo EAE tem sido utilizado para o estudo da EM e está associado com uma alteração na permeabilidade da BHE, um infiltrado focal perivascular de células mononucleares, gliose e, em alguns casos, observa-se desmielinização na região de substância branca no SNC (Brown, 2001).

A EAE pode ser induzida por injeção intraperitoneal (i.p) ou subcutânea (s.c) de peptídeos purificados de diferentes componentes da bainha de mielina, como MBP, PLP e MOG. A transferência de células T CD4+ específicas também é capaz de induzir a doença em linhagens de roedores e algumas espécies de primata (Bernard *et al.*, 1997; Bradl & Hohlfeld, 2003; Costa *et al.*, 2003). Uma resposta imune iniciada na periferia pela injeção do antígeno associado ao adjuvante completo de Freud (CFA), rapidamente desenvolve um processo inflamatório no SNC (Genain *et al.*, 1999; Costa *et al.*, 2003) (Tabela 1).

Na EAE, a doença pode ser evidenciada através de diferentes sintomas, como paralisia de cauda e de patas traseiras. Entretanto, as formas clínicas da EAE podem variar de acordo com o protocolo de indução utilizado, ressaltando diferenças entre os modelos animais e a EM (Johns *et al.*, 1995; Johns & Bernard, 1999; Bradl & Hohlfeld, 2003). A indução por MBP desenvolve a forma PP da EAE e através de seqüências peptídicas do proteolípídeo PLP, observa-se a forma SP. A MBP é um dos principais componentes protéicos da mielina, correspondendo a 30% da mielina total, e está presente no SNP e no SNC. Algumas seqüências peptídicas são consideradas mais encefalitogênicas em alguns grupos de pacientes EM (Warren *et al.*, 1995; Bradl & Hohlfeld, 2003). O PLP é uma molécula hidrofóbica expressa exclusivamente no SNC, como uma proteína transmembranar (Schmidt, 1999; Kramer *et al.*, 2001).

Uma atenção especial tem sido dedicada ao modelo de EAE induzido por MOG. Pacientes com EM têm apresentado uma resposta de anticorpos anti-MOG mais expressiva quando comparada aos níveis de anti-PLP e anti-MBP (Bernard *et al.*, 1997; Egg *et al.*, 2001; Haase & Linington, 2001). A glicoproteína MOG é

expressa apenas no SNC e está localizada nos corpos celulares e processos dos oligodendrócitos e na camada mais externa da bainha de mielina (Kroepfl *et al.*, 1996). A MOG, com peso molecular de apenas 60KDa, é o menor componente mielínico, representando apenas 0,01% a 0,05% da proteína total. A seqüência de aminoácidos da MOG é altamente conservada entre roedores e humanos, com aproximadamente 89% de homologia entre as espécies (Van Noort *et al.*, 1997; Rosbo & Bem-Num, 1998) (Figura 2).

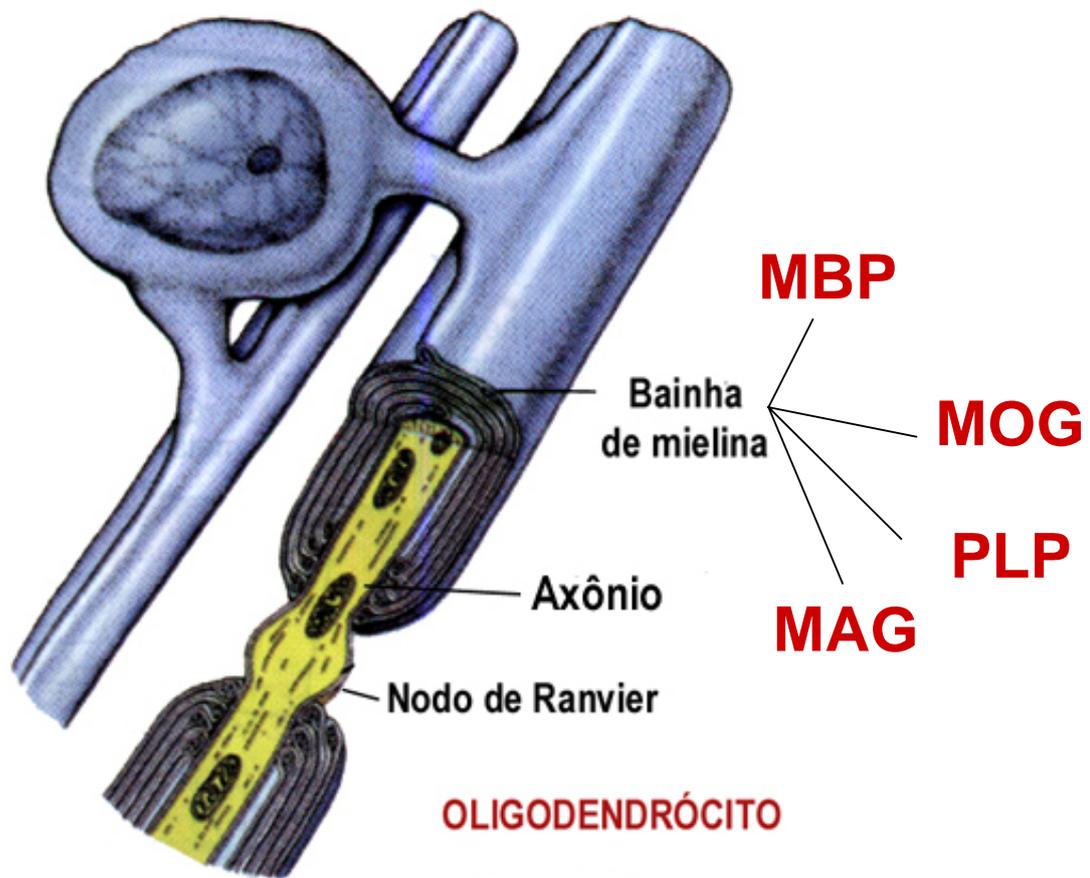


Figura 1. Composição da bainha de mielina

<b>PEPTÍDEO</b>	<b>LINHAGEM</b>
<b>MOG 35-55</b>	<b>C57BL/6 e rato Lewis</b>
<b>MOG 92-106</b>	<b>SJL/J</b>
<b>MBP nativa</b>	<b>Rato Lewis</b>
<b>MBP 87-89</b>	<b>SJL/J e SWR/J</b>
<b>PLP 139-151</b>	<b>SJL/J e SWX/J</b>
<b>PLP 178-191</b>	<b>SWX/J</b>

**Tabela 1. Sequências indutoras do modelo de EAE**

O modelo de EAE induzido por MOG foi descrito por Linington, inicialmente em ratos. E o modelo em camundongos da linhagem C57BL/6 induzido por MOG, peptídeo de sequência 35-55, pode ser definido como uma doença crônica caracterizada por inflamação mediada por células T, B e macrófagos. Os sinais clínicos podem aparecer em torno do dia 12 após a imunização, podendo progredir até o dia 20. Tem sido sugerido que células ativadas por MOG entram no SNC e ativam a microglia capaz de produzir TNF $\alpha$ , levando a indução de VCAM e ICAM. Essas moléculas de adesão facilitam o tráfego de células mononucleares através do endotélio (Juedes *et al.*, 2000).

A etiologia da EM ainda é desconhecida, mas tem sido mostrada uma forte associação entre infecção viral e o desenvolvimento e exacerbação da doença (Peacock *et al.*, 2003). Modelos de infecção por coronavírus (Hepatite) e por vírus Theiler têm sido utilizados para o estudo da EAE, desencadeando um processo de

desmielinização no SNC. Trabalhos recentes têm sugerido uma associação entre infecção por gama-herpes vírus (EBV) e o risco de adquirir EM. Níveis elevados de anticorpos anti-EBV foram detectados em mulheres com EM, sugerindo que este vírus possa estar envolvido com a etiologia da doença, através de um mecanismo de mimetismo molecular (Ascherio *et al.*, 2001).



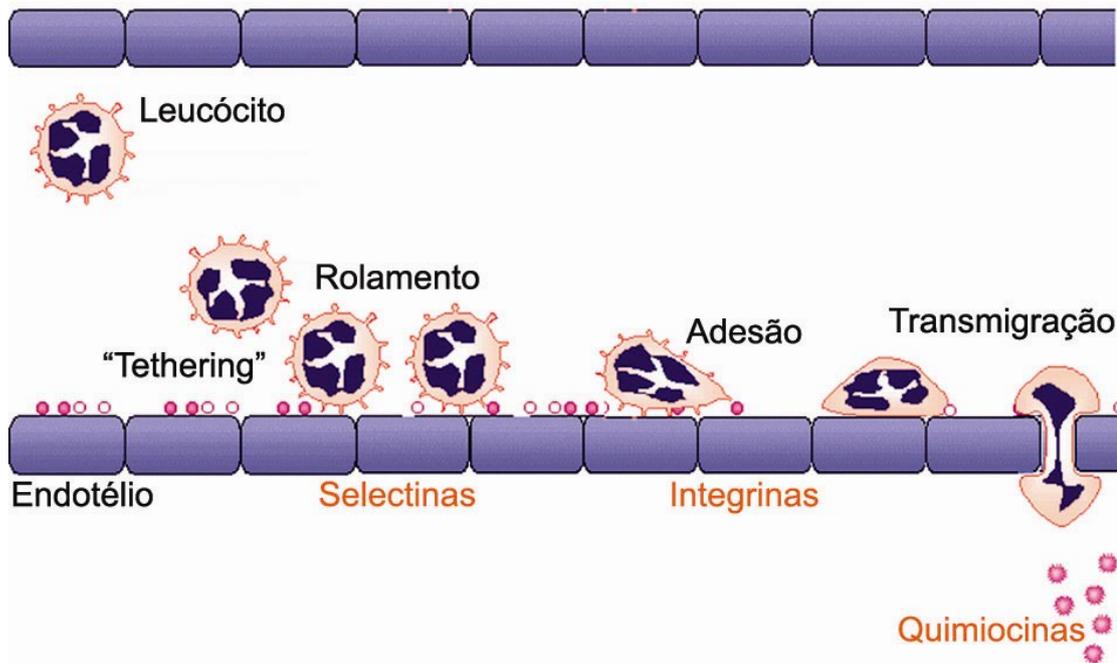
### 1.3. RECRUTAMENTO DE LEUCÓCITOS PARA O SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Leucócitos em repouso não são capazes de romper a BHE. Porém, uma vez ativados, podem atravessar a barreira independente de sua especificidade antigênica, mas apenas células T que reconhecem peptídeos do SNC persistem e podem recrutar outras células inflamatórias. Sugere-se que o endotélio cerebral expresse uma combinação de ligantes de adesão e fatores de ativação para receptores acoplados a proteína G, que permite a regulação do processo de recrutamento de leucócitos para o SNC (Piccio *et al.*, 2002).

Parece provável que componentes protéicos do SNC possam ter acesso ao tecido linfóide através do CSF e da região linfática cervical e, depois de processados e apresentados, podem estimular uma resposta antígeno-específica. Fatores diversos indicam que o SNC possui uma capacidade limitada para a reatividade imune e inflamatória. Essa proteção se dá também pelos capilares da microvasculatura do cérebro. Além disso, o SNC possui baixo nível de expressão de moléculas de MHC classe II, que parece ser restrita à microglia ativada e macrófagos fagocíticos (Ransohoff *et al.*, 2003).

O processo de extravasamento de leucócitos consiste numa seqüência de etapas controladas por moléculas de adesão, fatores de ativação e quimiocinas. As diferentes etapas da migração celular consistem em: contato inicial com a parede do vaso ("tethering"); rolamento ao longo da parede do vaso mediado por selectinas e seus ligantes carboidratos; ativação de integrinas por quimiocinas, levando a adesão firme, dependente de integrina e outras moléculas de adesão celular (CAMs); e

diapedese, quando ocorre a transmigração da célula pelo endotélio para o interior do tecido (Piccio *et al.*, 2002) (Figura 3).



**Figura 3. Mecanismo de recrutamento de leucócitos através do endotélio.**

As selectinas (E e P-selectinas) são glicoproteínas de membrana que se ligam a grupos específicos de carboidratos. Os membros desta família são induzidos no endotélio ativado e iniciam as interações leucócito-endotélio através de ligantes oligossacarídeos nos leucócitos. O papel das selectinas tem sido muito estudado, sugerindo uma importante participação no recrutamento celular, principalmente no processo de rolamento (Kerfoot & Kubes, 2002). Além do endotélio, as plaquetas também podem expressar P-selectina (Kurose *et al.*, 1997). A etapa de adesão ocorre a partir da indução de moléculas de adesão celular (ICAM e VCAM) no endotélio e sua interação com ligantes específicos expressos na membrana dos leucócitos, as integrinas (LFA-1,  $\alpha$ 4, Mac-1, etc). A forte adesão entre leucócitos e as

células endoteliais é promovida pela indução de ICAM-1 no endotélio e por uma mudança conformacional nas moléculas de integrinas pela ação das quimiocinas, levando a ativação dessas moléculas. (Kubes, 2002; Kerfoot & Kubes, 2002). O estágio final de extravasamento para o tecido constitui a diapedese, que requer uma reorganização do citoesqueleto.

Estudos *in vivo* da microcirculação de cremaster em camundongos imunizados com OVA mostraram que a ausência de P-selectina e ICAM-1 reduziu o rolamento de leucócitos (McCafferty *et al.*, 2000). Outros trabalhos mostram uma diminuição de rolamento e adesão de leucócitos nos vasos da pia máter em camundongos knockout para P-selectina tratados com TNF $\alpha$  (Carvalho-Tavares *et al.*, 2000).

#### **1.4. PARTICIPAÇÃO DAS QUIMIOCINAS NO MODELO DE EAE**

As quimiocinas constituem uma superfamília de proteínas com baixo peso molecular (8-14 Kda) que são importantes para a migração de leucócitos no desenvolvimento normal do sistema imune, assim como, na regulação da infiltração de células inflamatórias sob condições patológicas (Proudfoot, 2002; Biber *et al.*, 2002). São produzidas por diferentes tipos celulares, como linfócitos, macrófagos, neutrófilos, células endoteliais (Tran *et al.*, 2000). As quimiocinas são altamente expressas no SNC inflamado, apresentando uma relação temporal com algumas doenças (Rottman *et al.*, 2000).

A classificação das quimiocinas é baseada no número e disposição de resíduos de cisteína conservados na cadeia N-terminal. Desta forma, as famílias

foram agrupadas como C, CC, CXC e CX3C e seus receptores XCR, CCR, CXCR e CX3CR (Biber *et al.*, 2002). As pertencentes ao grupo CC ( $\beta$ -quimiocinas) são caracterizadas por duas cisteínas adjacentes; as do grupo CXC ou CX3C apresentam um ou três aminoácidos entre as cisteínas, enquanto que as XC apresentam apenas um resíduo de cisteína (Figura 4). Em humanos, existem 28 quimiocinas do tipo CC, incluindo CCL2, CCL7, CCL11, CCL8, CCL13, CCL1, CCL5, CCL3 e outras (Banisor *et al.*, 2005). E os receptores de quimiocinas possuem em torno de 50% de homologia entre eles e menos de 30% de homologia com outras classes (Cartier *et al.*, 2005).

As 28 quimiocinas que compõem esse grupo (CCL1-CCL28) interagem com 10 receptores (CCR1-CCR10), sendo que um mesmo receptor pode interagir com mais de uma quimiocina e uma mesma quimiocina pode se ligar com alta afinidade a mais de um tipo de receptor desta classe (Murphy *et al.*, 2000; Murphy, 2002) (Figura 5).

A estrutura dos receptores de quimiocinas baseia-se numa cadeia polipeptídica composta por aproximadamente 350 aminoácidos e, os resíduos de cisteína, que formam as pontes dissulfeto, estão presentes no domínio N-terminal e em cada três voltas extracelulares da molécula. O domínio C-terminal contém resíduos de serina e treonina que são fosforilados após ativação do receptor (Cartier *et al.*, 2005).

Esta interação de alta afinidade entre uma quimiocina e seu receptor é iniciada pela ativação da proteína G e sua dissociação nas subunidades  $G\alpha$  e  $G\beta\gamma$ . A subunidade  $G\alpha$  induz a ativação da via da fosfoinositol 3-quinase ( $PI_3K$ ), enquanto a

subunidade  $G\beta\gamma$  ativa a via da fosfolipase C e induz influxo de  $Ca^{++}$  e ativação da proteína quinase C (PKC) (Banisor *et al.*, 2005). Este aumento transitório de  $Ca^{++}$  intracelular tem sido bastante descrito como efetivo na estimulação de outras quimiocinas (Cartier *et al.*, 2005).

Além das funções no recrutamento de leucócitos, as quimiocinas também podem atuar na regulação e na polarização da resposta imune, apoptose, angiogênese, mitose, metástase tumoral, cicatrização de feridas e secreção de citocinas, metaloproteinases de matriz (MMPs), radicais livres, óxido nítrico (D'Ambrosio *et al.*, 2003; Mahad *et al.*, 2005; Banisor *et al.*, 2005).

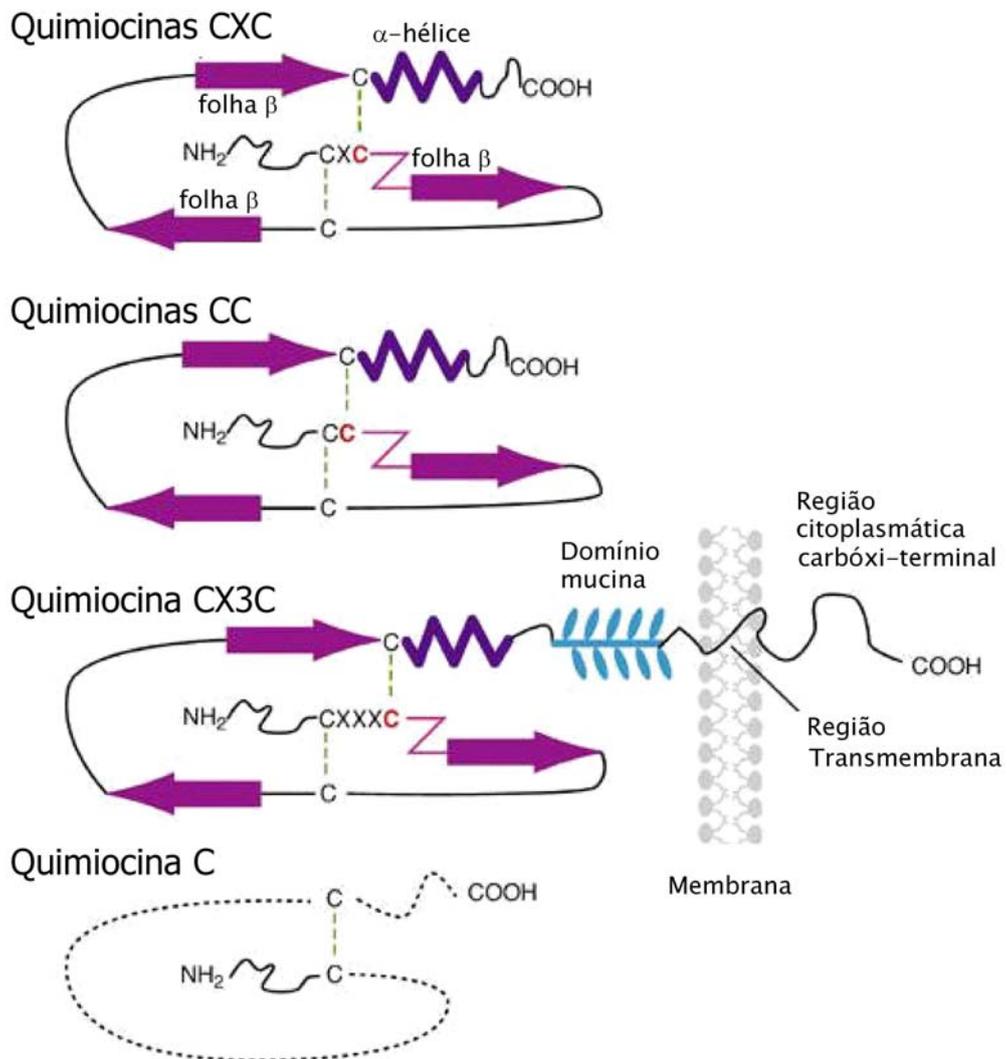


Figura 4. Classificação dos grupos de quimiocinas.

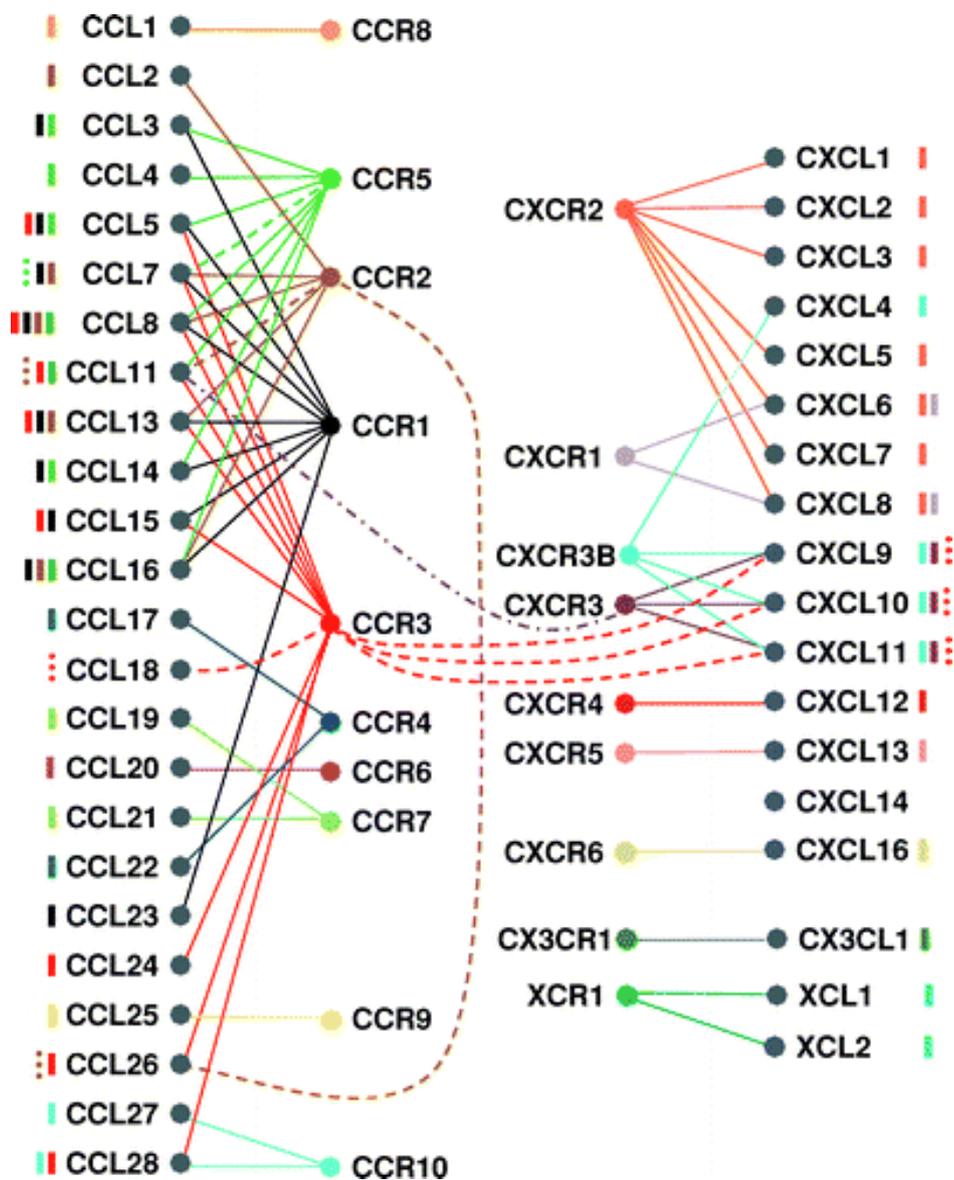


Figura 5. Relação de interação entre quimiocinas e seus receptores (Rot & Andrian, 2004).

No SNC, células residentes, como astrócitos, oligodendrócitos, microglia e neurônios são capazes de expressar receptores funcionais de quimiocinas. Entretanto, essa expressão é, preferencialmente, induzida por um estímulo inflamatório (Biber *et al.*, 2002). Por exemplo, trabalhos têm mostrado que as quimiocinas CCL2, CCL3, CXCL10 e CCL21 podem ser induzidas à expressão em neurônios sob condições de degeneração neuronal e, que essas moléculas são capazes de atrair leucócitos que migram através da BHE. Esses dados mostram uma possível participação das quimiocinas na ativação de uma resposta inflamatória crônica dentro do SNC (Biber *et al.*, 2002; Banisor *et al.*, 2005). No modelo EAE foi mostrado que camundongos knockout para CCR2 não desenvolvem sinais da doença (Biber *et al.*, 2002).

O receptor CCR2, que responde predominantemente à quimiocina CCL2, é expresso em humanos por quase todos os monócitos e, cerca de 15% de células T CD4<sup>+</sup> na circulação são CCR2<sup>+</sup> e também expressam marcadores de ativação crônica, como CD26. Estudos mostraram que pacientes com EM apresentaram menos CCL2 no liquor quando comparados com pacientes com desordens neurológicas não inflamatórias, no entanto, níveis elevados de CCL2 foram detectados nas lesões do SNC, sugerindo a hipótese de que CCL2 seja consumido por células migrantes CCR2<sup>+</sup> (Mahad *et al.*, 2005; Moreira *et al.*, 2006).

Análises da expressão de RNA mensageiro para quimiocinas em biópsias de tecido cerebral de pacientes portadores de EM demonstram um aumento das quimiocinas CCL3, CCL4, CCL5 e dos receptores CCR1 e CCR5 (Baranzini *et al.*, 2000; Boven *et al.*, 2000). Além disso, uma produção elevada da quimiocina CXCL10 foi verificada no cérebro de pacientes com meningite viral e EM (Proudfoot, 2002).

Contudo, esses dados mostram a participação das quimiocinas em diferentes patologias, assim como na EM, e a importância de novos estudos que propiciem um maior esclarecimento quanto aos mecanismos envolvidos na ação quimiotática dessas moléculas.

Além da interação de alta afinidade com receptores específicos, as quimiocinas também podem se ligar a glicosaminoglicanos (GAGs) de superfície celular no endotélio vascular e na matriz extracelular (Kuschert *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 2004). Tem sido sugerido que esta interação inibe a difusão das quimiocinas localmente produzidas e, conseqüentemente, promove a formação de um gradiente, por imobilização dessas quimiocinas. A migração celular parece requerer este processo de imobilização de quimiocinas e, desta forma, os GAGs são capazes de modular a apresentação da quimiocina ao seu receptor específico, além de impedir uma clivagem proteolítica (Figura 7), (Kuschert *et al.*, 1999; Proudfoot *et al.*, 2000; Proudfoot *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2004).

Os GAGs são biomoléculas formadas pela fusão de um núcleo protéico a polímeros lineares de carboidratos geralmente compostos pela união glicosídica entre monômeros de ácido urônico, que pode estar na forma de ácido idurônico ou glicurônico, com N-acetil-glicosamina ou N-acetil-galactosamina em graus variáveis de O- ou N-sulfatação, o que confere ao grupamento carboidrato a possibilidade de uma diversidade estrutural superior à das proteínas (Sasisekharan & Venkataraman, 2000). Além disso, os GAGs usualmente se associam a proteínas, formando proteoglicanos (Johnson *et al.*, 2004). E, os mais importantes são o sulfato de heparana (HS), a heparina (Hep), o sulfato de dermatana (DS), o sulfato de

condroitina (CS) e o ácido hialurônico (Sugahara *et al.*, 2003; Lau *et al.*, 2004) (Figura 6).

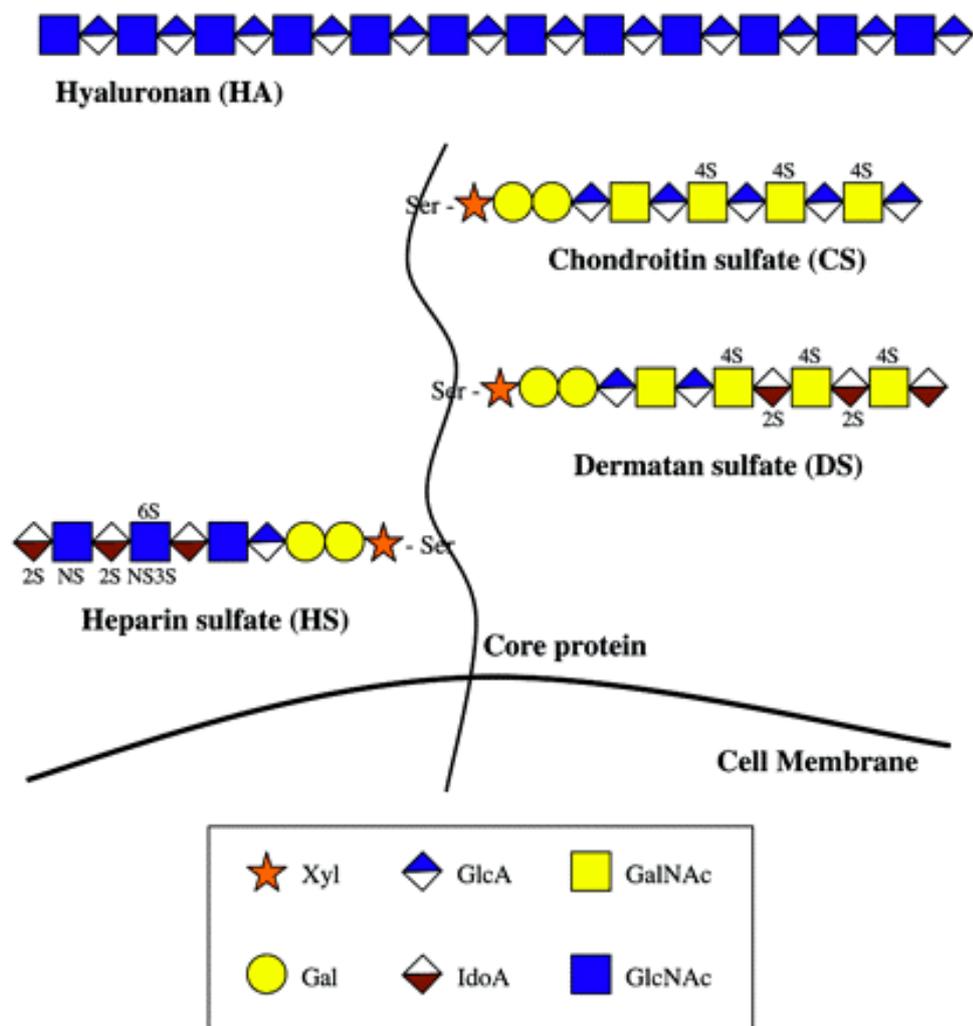


Figura 6. Estrutura das glicosaminoglinas e proteoglicanos (Taylor & Gallo, 2006)

A ligação de quimiocinas a GAGs é essencialmente determinada por interação eletrostática entre resíduos básicos carregados positivamente, como arginina e lisina, das quimiocinas e grupos carboxilados e sulfatados carregados negativamente dos GAGs (Martin *et al.*, 2001). Esta interação de baixa afinidade entre quimiocinas e GAGs tem sido demonstrada tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Kurschert *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 2005). Quimiocinas modificadas que perderam seu sítio de ligação a GAGs não foram capazes de promover a migração celular *in vivo* quando comparados com as quimiocinas em sua forma íntegra (Johnson *et al.*, 2005).

Estudos têm sido realizados a fim de elucidar essa possível especificidade de ligação entre as moléculas de quimiocinas e as GAGs. Um estudo demonstrou que uma mutação no domínio de ligação da quimiocina CCL5 a heparina foi capaz de reduzir em 80% a capacidade de ligação. Visto que a expressão de GAGs é regulada no sítio de inflamação, este fato pode ser um dos meios pelo qual o recrutamento é alcançado (Proudfoot *et al.*, 1999; Proudfoot *et al.*, 2001).

A exibição de uma atividade quimiotática implica na necessidade do estabelecimento de um gradiente de concentração. Entretanto, considerando as condições permanentes de fluxo sanguíneo e/ou linfático, seria impossível manter um gradiente de concentração de quimiocinas por período apreciável *in vivo*, se não houvesse meio da imobilização deste grupo de mediadores a outras moléculas insolúveis. Os GAGs fornecem um meio de estabelecimento deste gradiente na matriz extracelular e no endotélio de vasos de tecidos inflamados, pela afinidade que têm pelas quimiocinas (Tanaka *et al.*, 1993; Kurschert *et al.*, 1999). Deve-se

considerar que a composição de proteoglicanos de superfície celular depende da localização e do tipo de endotélio, o que deve controlar as quimiocinas que podem ser imobilizadas em diferentes focos da inflamação. Logo, é possível que a interação com GAGs possa modular a cinética de interação da quimiocina com o seu receptor (Kuschert *et al.*, 1999). Estudos *in vitro* têm demonstrado que as quimiocinas possuem afinidades diferentes por GAGs e, que esta interação pode afetar a oligomerização das quimiocinas e, portanto, seu papel via receptor transmembrana (Hoogewerf *et al.*, 1997; Ali *et al.*, 2000).

Além das moléculas de GAGs associadas ao endotélio, GAGs solúveis são encontradas em número razoável e, estas são capazes de reduzir o nível de inflamação em modelos animais (Proudfoot *et al.*, 2001). Sugere-se que a quimiocina livre pode interagir reversivelmente com receptores transmembrana e direcionar uma resposta celular. Mas, se a quimiocina está complexada com GAG solúvel, este complexo pode inibir a ligação da quimiocina com seu receptor (Proudfoot *et al.*, 2001). Portanto, o sistema de interação quimiocina-GAG pode ser mais complexo do que se conhece e o seu envolvimento com o processo de migração celular ainda mais criterioso.

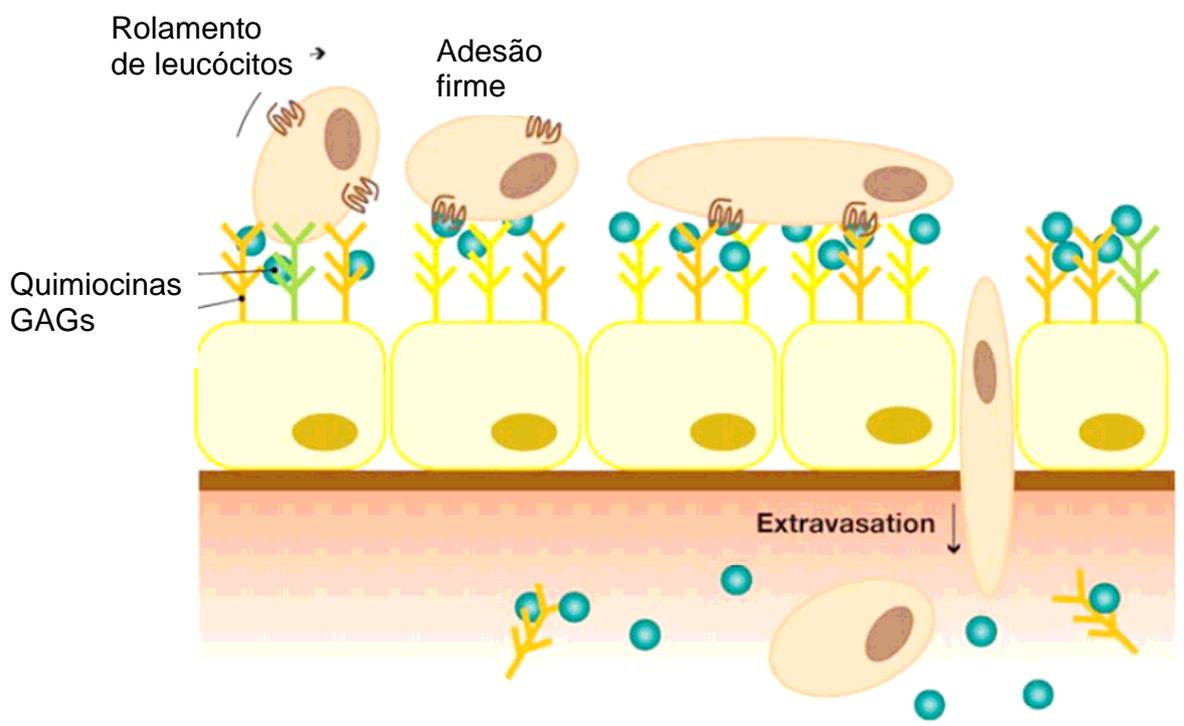
A quimiocina CCL2 tem recebido uma atenção especial quanto a sua participação em diferentes patologias. E sua estrutura molecular têm sofrido alterações quanto a resíduos de aminoácidos associados ao sítio de ligação ao receptor ou sítio de ligação a GAGs, como prolina, valina, treonina e tirosina, sendo substituídos por alanina, na tentativa de melhor discernir o mecanismo de ação. Uma dessas proteínas modificadas da CCL2 refere-se à proteína mutante P8A, [alanina-8]-CCL2. A mutação da prolina por alanina na posição 8 da molécula de CCL2 gera

um análogo que é um monômero. Este mutante se liga ao receptor CCR2, exibe atividade quimiotática *in vitro*, inibe adenil ciclase e estimula influxo de cálcio com a mesma afinidade e potência selvagem, no entanto, não induz migração celular *in vivo* (Paavola *et al.*, 1998). Esta proteína P8A corresponde ao fármaco utilizado neste trabalho.

Trabalhos têm sugerido que a dimerização da molécula de CCL2 é requerida para sua interação com receptor e, posterior, transdução de sinal intracelular (Zhang & Rollins, 1995; Paavola *et al.*, 1998). Uma vez identificados os aminoácidos importantes para a ligação de quimiocinas a GAGs, esses se tornam alvos para o desenvolvimento de mutantes deficientes na oligomerização ou ligação a GAGs.

O requerimento de uma forma dimerizada da quimiocina CCL2 para uma ligação de alta afinidade com o seu receptor específico não foi totalmente elucidado, porém, ainda é sustentada a hipótese de que o processo de oligomerização é necessário para o evento quimiotático promovido pelas quimiocinas. Além disso, foi evidenciado que a remoção de GAGs pelo tratamento com glicosidase causou uma redução na ligação de quimiocinas com receptores específicos (Lau *et al.*, 2004).

Algumas quimiocinas como CXCL8 (Rajarathnam *et al.*, 1994), CCL2 (Paavola *et al.*, 1998), CCL3 (Laurence *et al.*, 2000) e CCL5 (Proudfoot *et al.*, 2003), apesar de interagirem com seus receptores na forma monomérica são encontradas na forma de dímeros, tetrâmeros e/ou oligômeros de ordem superior e que esta oligomerização não só é facilitada pela presença de GAGs presentes na matriz extracelular e na superfície de células endoteliais (Hoogewerf *et al.*, 1997; Ali *et al.*, 2000) como é essencial para sua atividade *in vivo* (Lau *et al.*, 2004).



**Figura 7. Sistema de interação quimiocinas-GAGs durante a migração de leucócitos (Johnson *et al.*, 2005).**

## 1.5. SISTEMA CININA-CALICREÍNAS E POSSÍVEL PAPEL NO MODELO DE EAE

As cininas constituem peptídeos formados no plasma e em tecidos periféricos em resposta a ativação de uma classe de enzimas denominadas calicreínas, atuando em substratos cininogênicos. As cininas atuam sobre diferentes mecanismos fisiológicos, incluindo o controle da pressão arterial, contração de músculo liso ou relaxamento, permeabilidade vascular e mecanismo de transmissão da dor (Ferreira *et al.*, 2002). As ações das cininas são mediadas através da ativação de dois subtipos de receptores acoplados à proteína G, B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, com sete domínios transmembrana. Receptores B<sub>1</sub> são pouco expressos em tecidos normais (saudáveis), mas sua expressão pode ser aumentada sob condições particulares, como injúria e infecção. Por exemplo, o tratamento com LPS ou citocinas como IL-1 $\beta$  pode induzir a expressão do receptor B<sub>1</sub> (Noda *et al.*, 2003). Por outro lado, a bradicinina e a calidina exibem alta afinidade por receptores B<sub>2</sub> que são expressos constitutivamente e distribuídos através dos tecidos (Marceau *et al.*, 1998; Calixto *et al.*, 2000; Marceau & Regoli, 2004).

Uma vez formadas na periferia, as cininas ativam fibras A $\delta$  e C nos nervos sensoriais, produzindo dor, hiperalgesia ou alodinia, tanto em humanos quanto em modelos experimentais (Dray & Perkins, 1997). Além disso, acredita-se que as cininas exerçam um papel indireto sobre o processo inflamatório a partir da liberação

de mediadores pró-inflamatórios e hiperalgésicos. (Dray & Perkins, 1997; Calixto *et al.*, 2001).

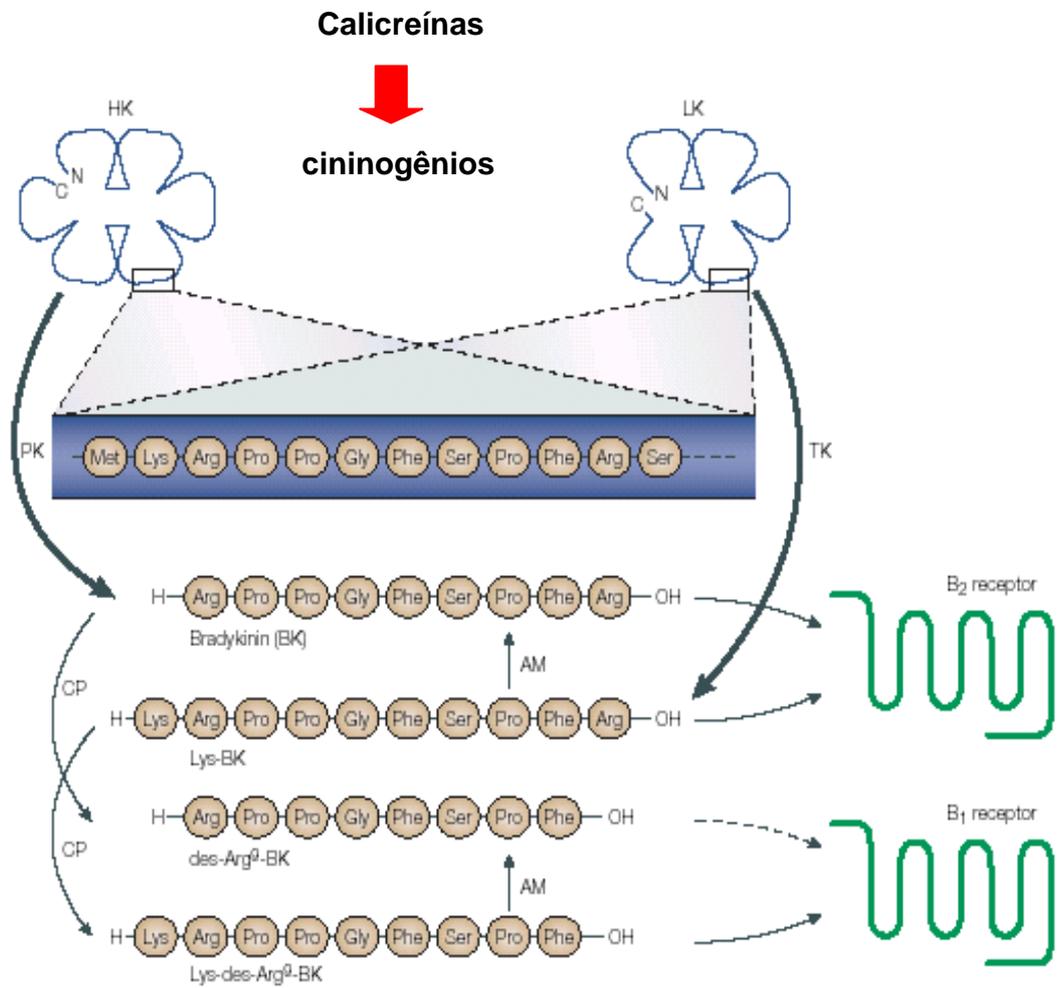
A bradicinina (BK), principal componente cinina, constitui um peptídeo com nove resíduos de aminoácidos, sendo positivamente carregado. Além de sua estrutura primária, seus metabólitos também são capazes de interagir com os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>. Em mamíferos foram identificadas três cininas importantes: BK, Lys-BK ou calidina e des-Arg-BK (Marceau & Regoli, 2004) (Figura 8). A BK é um mediador inflamatório e vasodepressor, produzido durante um trauma, sendo um essencial componente na mobilização de Ca<sup>2+</sup> intracelular (Noda *et al.*, 2003). E também é conhecida por sua função antagonista da angiotensina II e comunicação direta com receptores da angiotensina II tipo 1 (AT<sub>1</sub>) nas células de músculo liso (Marceau & Regoli, 2004).

Trabalhos têm demonstrado a participação do receptor B<sub>2</sub> nos sinais cardinais da inflamação aguda, incluindo aumento de permeabilidade vascular, vasoconstrição e dor através da ativação de nervos sensoriais temporários (McLean *et al.*, 2000). Entretanto, os efeitos antiinflamatórios de B<sub>1</sub> incluem promoção do tráfico de leucócitos, edema e dor. O receptor B<sub>1</sub>, calicreínas e cininogênios foram encontrados na superfície de neutrófilos circulantes e sinoviais, demonstrando um possível papel efetor do sistema cinina no sítio de inflamação (Araújo *et al.*, 2001). Contudo, tem sido sugerido que receptores B<sub>2</sub> estão envolvidos na fase aguda da inflamação e resposta da dor, ao passo que, B<sub>1</sub> participa da fase crônica da resposta inflamatória (Dray & Perkins, 1997).

Além de tecidos periféricos, a bradicinina exerce atividades fisiológicas no SNC (Hall & Geppetti, 1995; Schwaninger *et al.*, 1999). Entretanto, a participação da

BK durante a EM e no modelo EAE ainda não foi esclarecida. Um trabalho mostrou que a expressão do receptor  $B_1$  foi aumentada em células T derivadas de sangue periférico de pacientes EM. Mais tarde, o mesmo grupo demonstrou que esse aumento da expressão de  $B_1$  ocorria durante a fase de surto da doença (Prat et al., 1999; 2005). Esses dados sugerem que a ativação de receptores  $B_1$  e  $B_2$  pode compreender um importante mecanismo de regulação do sistema imune durante o desenvolvimento da EM e, também, no modelo de EAE.

Tem sido aceito que o rolamento de leucócitos é dependente da interação de selectinas e sua firme aderência na parede dos vasos é dependente da interação de integrinas com seus receptores. E uma das primeiras evidências de participação do sistema cinina surge ao demonstrar *in vitro* a expressão de P-selectina em células endoteliais sob a estimulação por bradicinina (Lehmberg *et al.*, 2003). Entretanto, o papel da bradicinina sobre o recrutamento de leucócitos para o SNC no modelo de EAE ainda não foi investigado.



**Figura 8. Sistema cinina-caliceínas e receptores**

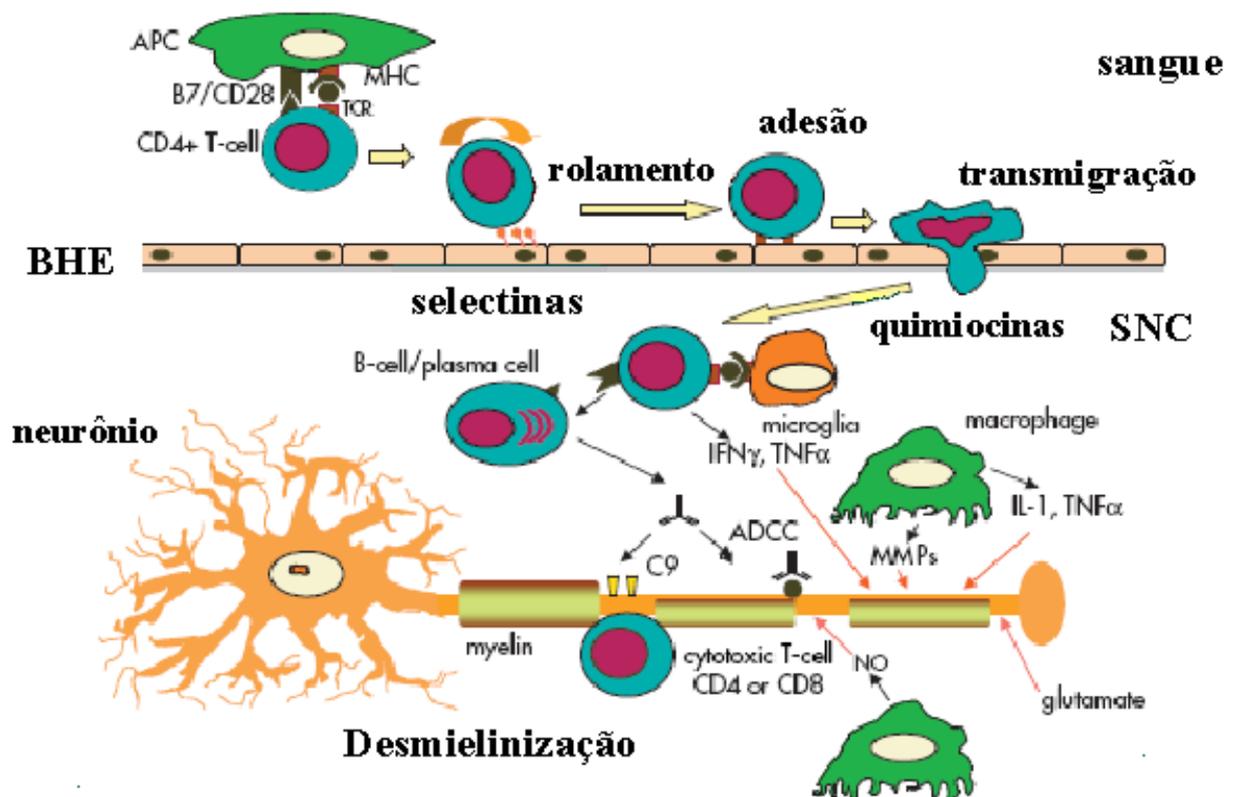


Figura 9. Hipótese da patogênese da Esclerose Múltipla e do modelo EAE (adaptado Giuliani & Yong, 2003).

**RACIONAL**

A Esclerose Múltipla, doença desmielinizante do SNC, tem sido caracterizada por uma resposta inflamatória crônica atribuída a presença de células T CD4+ autoreativas a componentes da bainha de mielina. E, o modelo de EAE em roedores tem sido utilizado por melhor representar a patogenia da EM, com intenso influxo de leucócitos ativados para o SNC. Portanto, uma das hipóteses mais aceita para a patogenia da EM e de seu modelo animal EAE é baseada numa ativação de linfócitos T CD4+ na periferia contra componentes da mielina. Uma vez ativados, esses linfócitos atravessam a BHE, desenvolvendo uma resposta inflamatória dentro do SNC, com a participação de outras células que serão ativadas, como micróglia e astrócitos e, diferentes mediadores inflamatórios, como citocinas, neurotoxinas, óxido nítrico e outros.

Desta forma, o processo de transmigração celular através da BHE constitui uma das etapas mais importantes durante o desenvolvimento da doença, culminando na destruição da bainha de mielina e lesão axonal. Visto que a interação leucócito-endotélio ocorre a partir de uma complexa rede molecular, é de extrema importância a avaliação da participação das diferentes moléculas liberadas localmente durante as etapas do processo de migração celular, incluindo as moléculas quimiotáticas e peptídeos vasoativas, como as cininas.

## **OBJETIVOS**

## 2. OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel das quimiocinas e dos receptores de bradicinina, B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, sobre o processo de recrutamento de leucócitos na microvasculatura cerebral de camundongos com EAE induzida com MOG<sub>35-55</sub>, assim como no desenvolvimento da doença.

### 2.1. Objetivos específicos:

- 2.1.1. Caracterizar o modelo de EAE induzido por MOG<sub>35-55</sub> através do estudo de diagnóstico clínico e análise histopatológica.
- 2.1.2. Analisar *in vivo* o recrutamento de leucócitos na microvasculatura cerebral através dos parâmetros rolamento e adesão pela técnica de microscopia intravital.
- 2.1.3. Analisar a produção de citocinas e quimiocinas em extrato de cérebro, assim como, avaliar seu papel durante o recrutamento leucocitário, através do tratamento com anticorpos específicos.
- 2.1.4. Avaliar o papel da quimiocina CCL2 através do tratamento com sua proteína mutante P8A durante o recrutamento de leucócitos para o SNC.
- 2.1.5. Investigar o papel dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> da bradicinina durante o desenvolvimento da EAE através da análise clínica e histológica.
- 2.1.6. Analisar *in vivo* o papel dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> da bradicinina sobre o recrutamento de leucócitos na microvasculatura cerebral de camundongos com EAE.

- 2.1.7. Investigar o papel dos receptores  $B_1$  e  $B_2$  na regulação da produção de citocinas e quimiocinas em extrato de cérebro de animais  $B_1^{-/-}$ ,  $B_2^{-/-}$  com EAE, utilizando o método de ELISA .
- 2.1.8. Avaliar a expressão do receptor  $B_1$  em extrato de cérebro de camundongo com EAE WT e  $B_2^{-/-}$  através da técnica de RT-PCR.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Animais**

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados camundongos fêmeas, da linhagem C57BL/6 com idade entre 9-11 semanas obtidos do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO-ICB-UFMG). Foram utilizados também animais knockout para o gene dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> da bradicinina da linhagem C57BL/6 x sv129, esses foram cedidos pelo Prof. Jorge Luiz Pesquero, do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB, UFMG. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética da UFMG.

#### **3.2. Reagentes e anticorpos**

Peptídeo MOG, sequência 35-55 (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK; Auspep) foi sintetizado pelo Dr. Luiz Juliano, Escola Paulista de Medicina (lote 1) e pelo Dr. Claude Bernard, La Trobe university, Victoria, Austrália (lote 2).

Albumina de soro bovino (BSA), orto-fenilenodiamino (OPD), tetra metil di-hidrocloreto de benzidina (TMB), brometo de metilamônio (HTAB) e Adjuvante Completo de Freund (CFA) foram obtidos pelo Sigma Chemical Co.

Solução de extração de citocinas: NaCl 0,4M, Tween 20 0,05%, BSA 0,5%, Fluoreto de fenil metil sulfônico (PMSF), cloreto de benzetônico (BC) 0,1mM, EDTA 10mM e aprotinina 20KI.

Fluido cerebrospinal artificial (FCE), composição iônica em mmol/L: NaCl 132, KCl 2.95, CaCl<sub>2</sub> 1.71, MgCl<sub>2</sub> 0.64, NaHCO<sub>3</sub> 24.6, dextrose 3,71 e urea 6.7, pH 7.4, at 37°C.

Anticorpos policlonais anti-murino, anti-CCL2 e anti-CCL5: cedidos pelo Dr. N.W. Lukacs (University of Michigan, Ann arbor) e previamente testados no bloqueio efetivo das respectivas proteínas (Lukacs *et al.*, 1997; Chensue *et al.*, 1999; Coelho *et al.*, 2002).

Quimiocina CCL2 e sua proteína mutante P8A, [Alanina-8]-CCL2, que sofreu uma substituição do resíduo de prolina por uma alanina na posição 8 na molécula (Serono Pharmaceutical S.A).

### **3.3. Indução do modelo de EAE em camundongos**

A Encefalomielite Autoimune Experimental, modelo animal da Esclerose Múltipla, foi induzida em camundongos fêmeas, das linhagens C57BL/6 e C57BL/6 x sv129 (9-11 semanas) por injeção subcutânea (s.c) de 100µl/animal da emulsão, contendo (v/v): peptídeo MOG<sub>35-55</sub>, seqüência MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK, 100µg/animal em PBS 1X e *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (Difco, St. Louis, MO), 4mg/ml em Adjuvante Completo de Freud (CFA). E, uma injeção intraperitoneal (i.p) de Pertussis toxina, 300ng/200µl/animal em PBS 1X, foi administrada no momento da indução e uma segunda dose 48 horas depois.



**C57BL/6 fêmeas  
(9-11 semanas)**

Injeção s.c. de emulsão: MOG<sub>35-55</sub> (100μg) +  
CFA + *M. tuberculosis* (4ma/ml)



Injeção i.p. de Pertussis toxina (300ng/200μl);  
1<sup>a</sup> dose na indução e 2<sup>a</sup> dose 48h depois

**Figura 10. Protocolo de indução do modelo murino EAE**

### **3.4. Avaliação do desenvolvimento clínico da EAE**

Os animais, após imunização com epítipo específico MOG<sub>35-55</sub>, foram monitorados diariamente quanto às manifestações clínicas da doença. Para a avaliação do grau de severidade da EAE, os animais foram classificados segundo uma escala de pontuação clínica previamente descrita (Kerfoot & Kubes, 2002).

**Tabela 2. Escala de severidade clínica do modelo murino de EAE.**

<b>Escala</b>	<b>Sinais clínicos da doença</b>
0	Sem sinais clínicos
1	Paralisia da cauda
2	Paralisia da cauda e fraqueza nas patas posteriores
3	Paralisia de pata posterior
4	Paralisia de pata posterior e fraqueza nas patas anteriores

(Kerfoot & Kubes, 2002)

Os animais também foram avaliados quanto à perda de peso corporal. Logo, foram pesados antes do processo de indução e após o aparecimento dos sinais clínicos pertinentes ao modelo.

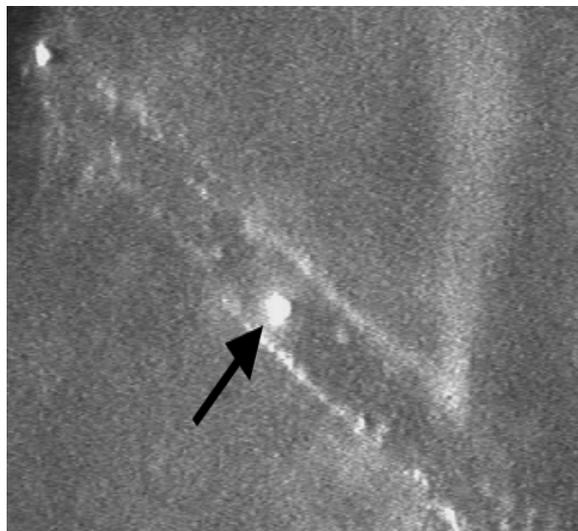
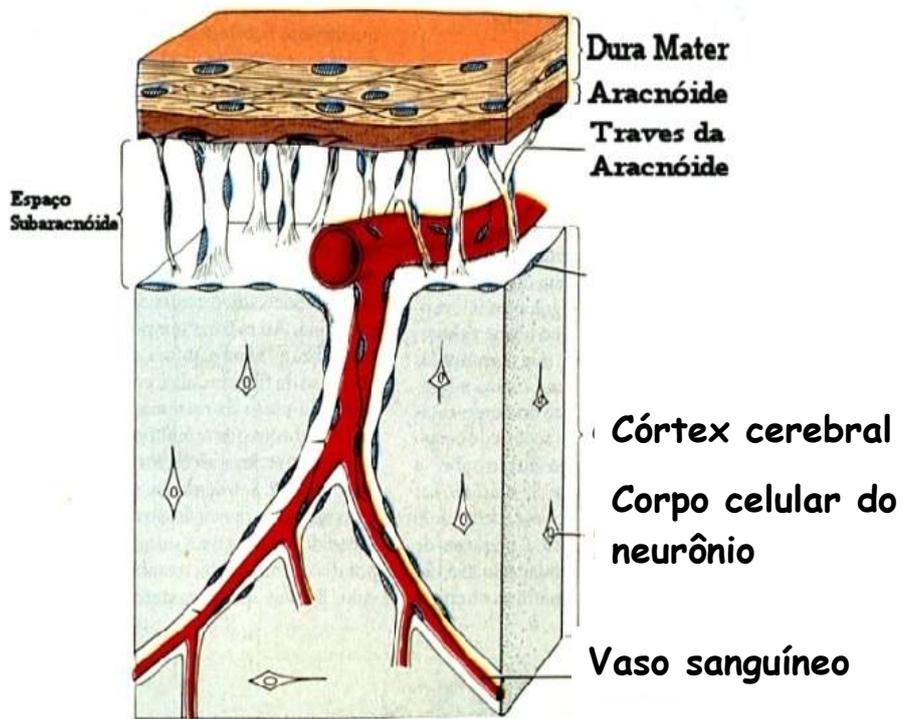
### **3.5. Microscopia intravital na microvasculatura cerebral**

A técnica de microscopia intravital foi utilizada para visualização da microvasculatura cerebral de camundongo.

Os animais foram anestesiados com uma mistura de xilazina (10mg/kg, Rompun<sup>®</sup>, Bayer) e Ketamina S+ (200mg/kg, Cristália, SP) injetada via i.p. A veia da cauda foi canulada para administração de substância fluorescente, como Rodamina 6G, reagentes experimentais e volume adicional de anestésico. A Rodamina 6G foi utilizada pela capacidade de marcar leucócitos, permitindo a visualização mesmo na presença de uma velocidade de fluxo alta. A temperatura corporal foi continuamente monitorada através de um sensor introduzido no reto do animal e mantida a 37°C

com ajuda de uma manta térmica (Fine Science Tools, Vancouver, Canadá). Para a visualização dos vasos sanguíneos na região das meninges, foi realizada uma craniotomia na região parietal, utilizando uma mini-broca. Desta forma, a dura-máter foi removida e os vasos da pia-máter foram visualizados (Figura 11). Durante o procedimento, a superfície do cérebro foi superfundida com uma solução artificial de FCE e todos os experimentos foram realizados durante um período máximo de 1 hora.

Para a avaliação do processo de recrutamento de leucócitos nos vasos da pia-máter, os animais receberam, inicialmente, uma injeção de rodamina 6G (0,3 mg/kg) para marcação dos leucócitos. A fluorescência associada ao corante foi visualizada por epi-iluminação a 510-560nm, usando um filtro de emissão de 590nm. Um microscópio (Olympus BX40) com objetiva de 20X, correspondendo a  $100\mu\text{m}^2$  de área, foi utilizado para observar os eventos de rolamento e adesão celular na parede dos vasos. Uma câmera de vídeo (Optronics) instalada ao microscópio projetava a imagem em um monitor e as imagens eram, então, gravadas em vídeo-cassete (VHS, Semp Toshiba, modelo x685) para posterior contagem do número de leucócitos em rolamento e aderidos na parede dos vasos. Foram considerados aderidos os leucócitos que permaneceram estacionados no endotélio vascular por um período mínimo de 30 segundos, enquanto que o rolamento foi considerado para os leucócitos que migravam da região central para a margem do vaso e se moviam a uma velocidade menor que a velocidade dos eritrócitos. Foram avaliados quatro a cinco vasos sanguíneos por animal e os resultados de rolamento e adesão foram expressos como número de células/min.



**Figura 11. Região perivascular das meninges**

### **3.6. Avaliação *in vivo* do recrutamento de leucócitos após o tratamento com anticorpo anti-CCL2 e anti-CCL5**

Camundongos C57BL/6 com EAE foram tratados com uma injeção i.p. (300 µl/animal) de anticorpo policlonal anti-CCL2 murino e anti-CCL5 murino, duas horas antes do procedimento de microscopia intravital. Estes anticorpos são efetivos no bloqueio das respectivas proteínas e têm sido testados em vários sistemas *in vivo* (Lukas *et al.*, 1997; Chensue *et al.*, 1999; Coelho *et al.*, 2002).

### **3.7. Tratamento com a quimiocina CCL2 e sua proteína mutante P8A**

Camundongos fêmeas C57BL/6 com EAE receberam tratamento com a proteína mutante P8A e com a quimiocina CCL2, de acordo com quatro diferentes protocolos experimentais.

**Protocolo 1:** Este protocolo experimental correspondeu ao tratamento com a proteína P8A e foi realizado em dois grupos (n=6/grupo), um recebeu o tratamento durante 5 dias, antes do aparecimento dos sinais clínicos da doença (T1) e, o outro grupo foi tratado durante 5 dias a partir dos primeiros sinais (T2). Este calendário foi baseado em ensaios prévios, em que os sinais clínicos foram observados em torno do dia 12 após a imunização com o peptídeo MOG<sub>35-55</sub>, com um pico de deficiência neurológica no dia 14. O primeiro tratamento foi realizado com doses diárias de 10 e 30µg via s.c. de P8A em 200µl de PBS 1X. A partir dos primeiros resultados, o tratamento seguiu com doses de 30µg/dia/animal via s.c. A partir deste tratamento foi avaliado o perfil clínico de cada grupo.

Neste protocolo, foi realizada microscopia intravital da microvasculatura cerebral para análise dos parâmetros de rolamento e adesão. Os animais (n=6) receberam um tratamento com 30 $\mu$ g/ i.p de P8A, 1 hora antes do procedimento.

**Protocolo 2:** O segundo protocolo experimental foi realizado em três grupos de animais (n=6/grupo). O grupo de tratamento T1 recebeu uma dose única de 30 $\mu$ g s.c de P8A no dia 10 após indução da doença; o grupo T2 recebeu a mesma dose a cada dois dias, 10, 12 e 16 após indução e o grupo T3 recebeu dose diária durante 5 dias a partir do dia 10. A partir do tratamento foi avaliado o perfil clínico de cada grupo.

**Protocolo 3:** Neste protocolo foram envolvidos 3 grupos de tratamento (n=5/grupo). O grupo T1 recebeu 30 $\mu$ g/dia s.c de P8A, o grupo T2 recebeu a mesma dose da quimiocina CCL2 e o grupo T3 recebeu dose única de 30 $\mu$ g s.c de CCL2. Ambos os tratamentos foram iniciados no dia 10 após a indução de EAE e realizados durante cinco dias.

**Protocolo 4:** Neste protocolo foram analisados os parâmetros de rolamento e adesão leucocitária na microvasculatura cerebral através da microscopia intravital. O grupo T1 foi tratado com 30 $\mu$ g s.c da proteína P8A e o grupo T2 foi tratado com a mesma dose de CCL2. Ambos os grupos (n=5/grupo) receberam o tratamento 1 hora antes do procedimento de microscopia intravital.

Todos os protocolos de tratamento foram acompanhados de grupos controle que receberam o mesmo volume de PBS 1X s.c.

### **3.8. Preparo do extrato de cérebro**

Após o procedimento de microscopia intravital, o cérebro foi removido e estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Para obtenção do extrato cerebral, cada hemisfério foi homogeneizado numa solução adequada de extração (100mg/ml), utilizando o homogenizador Ultra-Turrax. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000rpm/10min a  $4^{\circ}\text{C}$  e os sobrenadantes recolhidos e estocados a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para posterior análise.

### **3.9. Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para medida dos níveis de citocinas e quimiocinas no extrato cérebro**

O ensaio Imunoenzimático foi realizado a partir do sobrenadante de extrato de cérebro obtido conforme procedimento acima. A concentração utilizada para os anticorpos e reagentes foi baseada nos protocolos dos fabricantes (R&D Systems, e Pharmingen). Placas de 96 poços (Nunc. Immunosorb, Naperville, IL) foram inicialmente, recobertas com anticorpo purificado,  $100\mu\text{l}/\text{poço}$  em PBS 1X pH 7,4, específico para a molécula em análise ( $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IFN}\gamma$ , CCL2, CCL3, CCL5, CXCL10) e incubadas por 18 horas a  $4^{\circ}\text{C}$ . Numa segunda etapa, as placas foram lavadas em PBS 1X acrescido de Tween 20 e bloqueadas em BSA 1% em PBS 1X ( $200\mu\text{l}/\text{poço}$ ) por 2 horas sob agitação. Amostras do sobrenadante de extrato de cérebro diluídas 1:3 em BSA 1% PBS foram adicionadas em duplicada ( $100\mu\text{l}/\text{poço}$ ), seguindo de incubação 18 horas a  $4^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, foi adicionado anticorpo específico biotilado e, após 1 hora, foi utilizada uma solução de streptavidina acoplada a enzima peroxidase (HRP, 1:4000) numa concentração de  $5\mu\text{l}/\text{ml}$ , seguindo de

incubação por 20 minutos sob agitação a temperatura ambiente. A reação foi desenvolvida pela adição de 100µl/poço do cromógeno OPD 4mg/ml, contendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2µ) em tampão citrato pH 5,0 e a absorbância lida em espectrofotômetro a 492nm. A concentração referente a cada amostra foi calculada a partir de uma curva padrão correspondente.

### **3.10. Ensaio de mieloperoxidase (MPO)**

O ensaio de MPO foi utilizado para avaliar a presença de neutrófilo no cérebro de camundongo. O tecido cerebral, correspondente a um hemisfério, foi removido e homogeneizado (Ultra-Turrax) em tampão adequado pH 4,7, contendo: NaCl 0,1 mol/L, NaPO<sub>4</sub> 0,02 mol/L e Na-EDTA 0,015 mol/L, 100mg/1,9ml. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 10.000rpm/10min/4°C, o sobrenadante desprezado e o pellet foi exposto à 1,5ml de solução hipotônica (NaCl 0,2%), após 30 segundos foi adicionado o mesmo volume de uma solução contendo NaCl 1,6% e glicose 5%. Após centrifugação, o pellet foi ressuscitado em tampão NaPO<sub>4</sub> 0,05 mol/L pH 5,4, contendo HTAB 0,5% e re-centrifugado. Alíquotas de 1mL foram transferidas para microtubos, passando por 3 ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido e, novamente, centrifugadas a 10.000 rpm/15min/4°C.

O ensaio foi realizado numa placa de 96 poços com adição de 25µl de cada amostra e 25µl do cromógeno TMB 1mmol/L, seguido de incubação a 37°C/5min. Posteriormente, foi adicionada solução de NaPO<sub>4</sub> 0,08M e 100µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5mmol/L) com mais uma incubação 37°C/5min. A atividade da enzima mieloperoxidase foi avaliada por medida espectrofotométrica a 450nm e a

concentração obtida a partir da curva padrão, previamente estabelecida através de amostras de neutrófilos purificados.

### **3.11. Transcriptase Reversa – Reação de Polimerização em Cadeia (RT-PCR)**

#### **3.11.1. Extração de RNA total de cérebro de camundongo**

O tecido cerebral, correspondente a um hemisfério, foi removido, homogeneizado em Trizol (Gibco, BRL), 100mg/ml, e incubado por 15 minutos a 4°C. Em cada amostra foram adicionados 200µl de clorofórmio/mL de Trizol, seguindo com uma homogeneização de 15 segundos, em vortex, e incubação de 2-3 minutos a 4°C. Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 10.000rpm/15min a 4°C. A fase aquosa foi, então, coletada e transferida para outro tubo contendo isopropanol 500µl/ml de Trizol e, novamente, o material foi homogeneizado, incubado por 10min a 4°C e centrifugado a 10.000rpm/10min a 4°C. O sobrenadante foi cuidadosamente removido e o pellet lavado com 1 mL de etanol a 75% e submetido a uma nova centrifugação 5000rpm/5min a 4°C. O RNA, depois de seco, foi ressuspendido em 50µl de água (livre de RNase). Uma diluição da amostra (1:200) foi utilizada para a dosagem do RNA em espectrofotômetro a 260 e 280nm e, o material foi indicado para uso quando a razão entre 260/280nm estava entre os valores 1 e 2. Para estabelecer a concentração do RNA extraído, foi utilizada a leitura em 260nm.

#### **3.11.2. Transcrição reversa do RNA para obtenção do cDNA**

Em um tubo contendo 1µg de RNA (5µl), foi adicionada uma mistura contendo: 1µl de Oligo dT (500ng/ml; Gibco BRL); 0,2 µl de RNAsin (inibidor de RNase, 40U/µl,

Promega Biotech); 1,8  $\mu$ l de dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP; 0,2mM cada, oligonucleotídeos para a formação da fita de DNA complementar); 2,5  $\mu$ l do tampão Tris-HCl (50mM , pH 8,3, Gibco BRL); e 1,0 $\mu$ l da enzima transcriptase reversa (100U/ $\mu$ l). Esta enzima é uma DNA polimerase dependente de RNA que estende a fita de cDNA no sentido 5'→ 3', sem o domínio de clivagem do RNA, o que a torna mais eficiente. A reação ocorre em um termociclador a temperaturas previamente ajustadas, e após a síntese do cDNA, este é acrescido com 87,5 $\mu$ l de H<sub>2</sub>O estéril para um volume final de 100 $\mu$ l.

### **3.11.3. Reação de polimerização em cadeia - PCR**

A amplificação do material obtido foi realizada em microtubos a partir de 1 $\mu$ l de cDNA e uma mistura contendo: 0,8 $\mu$ l de dNTPs (0,2mM cada); 1,0  $\mu$ l de tampão Tris-HCl (10mM, pH 8,3, Gibco BRL); 1,0  $\mu$ l de cada par de primer (sense e antisense, 5pM/ $\mu$ l cada) específico para a molécula analisada; 0,05 $\mu$ l da enzima Taq DNA polimerase (5U/ml) e 6,15 $\mu$ l de água estéril. O material foi amplificado em ciclos de: desnaturação inicial (95°C/3min); segunda desnaturação (94°C/1min); anelamento (58°C/1min); polimerização da fita (72°C/2min) e uma extensão final (72°C/7min). O número de ciclos pode variar de acordo com o tamanho da molécula estudada, como segue: hypoxantina fosforibosil transferase (HPRT), sense 5' GTTGGATA CAGGCCAGACTTTGTTG-3', antisense 5'-GATTCAACTTGCGCTCATCTTAGGC-3', 162pb, 58°C, 32 ciclos, usado como gene constitutivo, receptor B<sub>1</sub>, sense 5'-AACCGCTTCAACTGGCCC- 3', e antisense 5'- AGACATAAATCAGTGGGTTC-3', 646pb, 59°C, 34 ciclos.

A separação do produto amplificado foi realizada através de eletroforese em gel de poliacrilamida em tampão borato-EDTA (TBE) 5X. Uma mistura contendo 5 $\mu$ l da amostra e 6 $\mu$ l do corante (azul de bromofenol 0,025%), foi aplicada no gel. Para uma análise qualitativa, foi utilizado um padrão de peso molecular. O gel foi submetido a uma voltagem de 100V por 1 hora em tampão TBE 1X. Posteriormente o gel foi corado em solução de nitrato de prata, permitindo a visualização das bandas correspondentes.

### **3.12. Análise histopatológica**

Para o estudo histopatológico foram utilizadas amostras de cérebro, medula espinhal e cerebelo. Após a remoção, as amostras foram rapidamente colocadas em solução de formalina 10% para fixação do tecido. O ensaio foi prosseguido com uma técnica de coloração em que segmentos de 4 $\mu$ m foram marcados com hematoxilina e eosina (H&E) e analisados em microscópio (Axioplan II, Zeiss). Foram avaliados cortes referentes a regiões perivasculares da pia máter nas meninges e do parênquima cerebral com enfoque na presença de infiltrado inflamatório.

### **3.13. Análise estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Para análise estatística foram utilizados os testes t-student e One-Way ANOVA, complementados com o teste Bonferroni para comparações múltiplas. A significância estatística considerou valores de  $P < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

## **PARTE I**

Avaliação do papel das quimiocinas sobre o processo de recrutamento de leucócitos na microvasculatura cerebral de camundongos com EAE induzidos com MOG<sub>35-55</sub> , assim como no desenvolvimento da doença.

## **4. RESULTADOS**

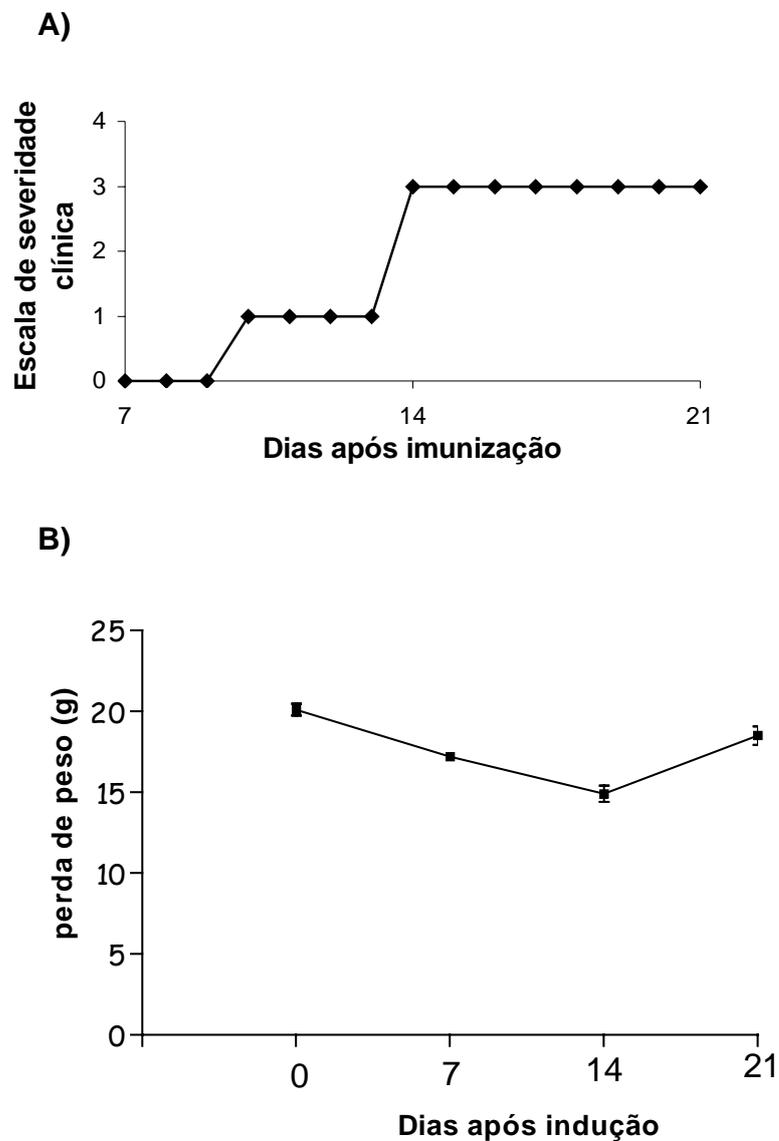
### **4.1. Avaliação do desenvolvimento clínico e inflamatório do modelo murino de EAE induzido por MOG<sub>35-55</sub>**

#### **4.1.1. Avaliação clínica e histopatológica**

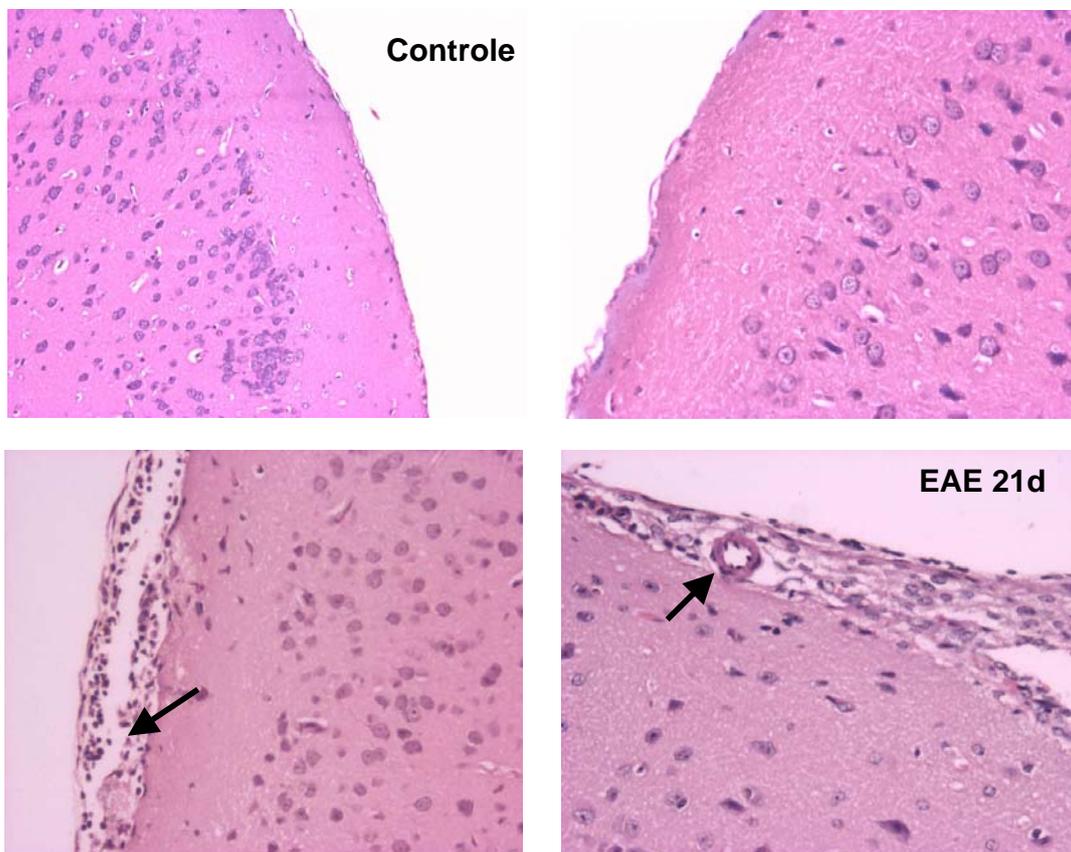
Após a indução do modelo de EAE em camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 por imunização com o peptídeo MOG<sub>35-55</sub>, o desenvolvimento clínico da doença foi acompanhado diariamente e os resultados apontados nos dias 7, 14 e 21 após a indução. Os sinais clínicos foram observados a partir do dia 10, sendo que o pico de manifestações clínicas ocorreu em torno do dia 14. A partir deste dia, não foi observada piora no quadro clínico, assim como novas manifestações de deficiência neurológica, permanecendo estável até o dia 21 (Figura 12a). Os resultados foram expressos como valor máximo alcançado baseado em uma escala de severidade clínica previamente descrita (Kerfoot & Kubes, 2002). Em concordância com o quadro clínico observado, uma perda acentuada de peso ocorreu em torno do dia 14 após a indução (Figura 12b).

A análise histopatológica, realizada a partir de cortes do cérebro, mostrou um marcante infiltrado inflamatório composto, predominantemente, por células mononucleares, na região perivascular das meninges. E, este perfil inflamatório foi corroborado com o quadro clínico observado, apresentando um foco de inflamação marcante no 14º dia após indução da doença. A ausência de polimorfonucleares foi

confirmada através do ensaio de mieloperoxidase (MPO), descrito anteriormente (Figura 13).



**Figura 12. Avaliação do desenvolvimento clínico do modelo murino de EAE induzido por MOG<sub>35-55</sub>.** Animais C57BL/6 com EAE (n=15) foram monitorados diariamente quanto à manifestação dos sinais clínicos da doença (A) e quanto à perda de peso corporal (B). O acompanhamento ocorreu durante 21 dias após a indução e os resultados foram expressos a partir de uma escala de severidade clínica, previamente descrita, e como média do peso por grupo em gramas (média  $\pm$  EPM).



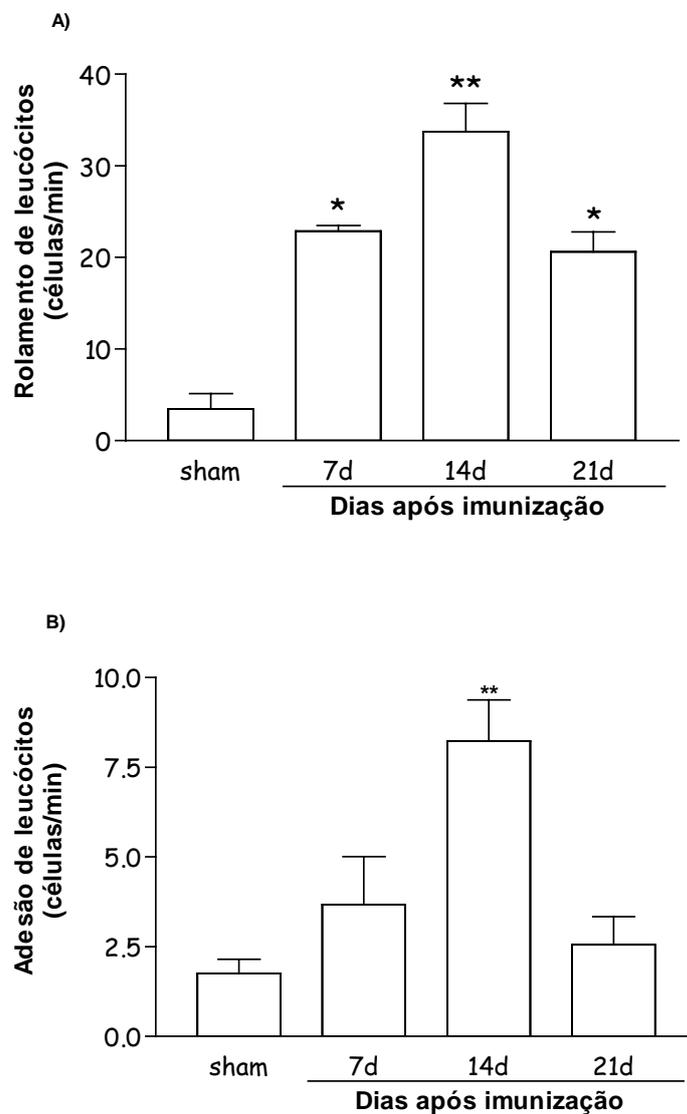
**Figura 13 . Análise histopatológica do cérebro de animais com EAE.** Cortes transversais do cérebro corados com hematoxilina e eosina (H&E), referentes às regiões perivasculares das meninges e do parênquima cerebral foram qualitativamente analisados quanto à presença de infiltrado inflamatório. Foram incluídas amostras referentes aos dias 7, 14 e 21 após a imunização, seguindo a mesma cinética previamente estabelecida.

#### 4.1.2. Avaliação do recrutamento de leucócitos na microvasculatura cerebral

As interações leucócito-endotélio vascular no cérebro de camundongos com EAE foram avaliadas através da técnica de microscopia intravital. O ensaio prosseguiu nos dias 7, 14 e 21 após imunização com MOG<sub>35-55</sub>, obedecendo à cinética dos experimentos anteriores. Foram avaliados *in vivo* os processos de rolamento e adesão de leucócitos nos vasos da pia-máter e os resultados foram expressos em número de células por minuto.

No dia 7 após a indução da doença foi possível observar um discreto aumento no número de leucócitos em rolamento ao longo da parede dos vasos. Entretanto, no dia 14 foi observado um aumento acentuado do processo de rolamento quando comparado com o grupo sham. No dia 21, o número de leucócitos em rolamento diminuiu, alcançando valores próximos aos encontrados no grupo do dia 7 (Figura 14a).

O perfil de adesão leucocitária, nos mesmos vasos, foi similar ao processo de rolamento, com um aumento acentuado também no dia 14 após indução (Figura 14b). Visto que as diferentes etapas que antecedem a migração de leucócitos através do endotélio podem ser reguladas por diferentes moléculas mediadoras, tornam-se cada vez mais pertinentes os estudos das interações moleculares capazes de orquestrar tais eventos.



**Figura 14. Análise *in vivo* do recrutamento de leucócitos na microvasculatura cerebral de camundongo com EAE.** A análise foi realizada, utilizando a técnica de microscopia intravital, que permitiu a contagem do número de leucócitos em rolamento (A) e aderidos na parede dos vasos (B) da pia-máter dos animais (n=7/grupo). O estudo ocorreu nos dias 7, 14 e 21 após a imunização. Os resultados foram expressos como nº de células/minuto (media  $\pm$  EPM), e o teste não-paramétrico ANOVA indicou: \*\*\*P < 0,001 em relação ao grupo controle.

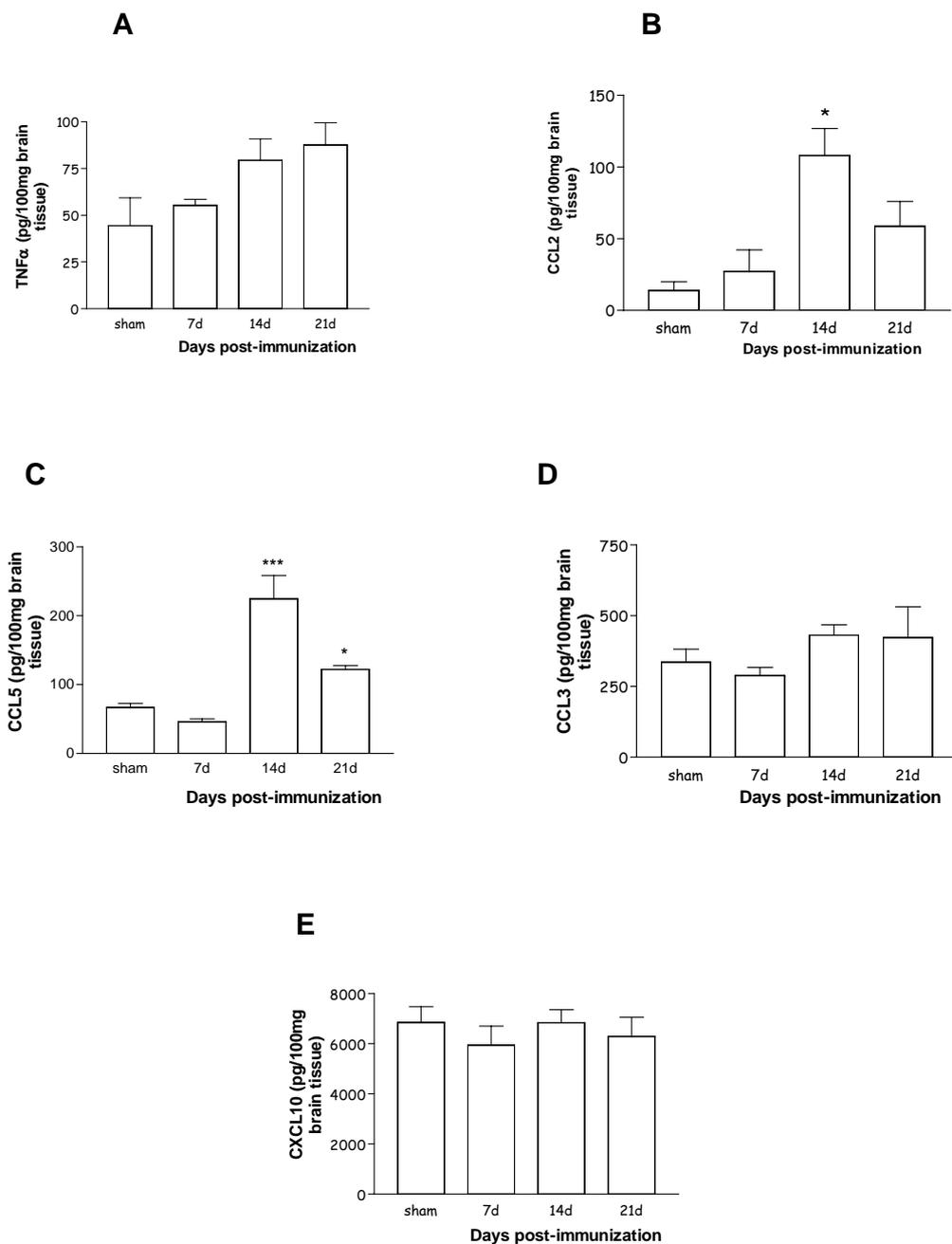
#### **4.1.3. Participação das quimiocinas no recrutamento de leucócitos durante a EAE**

Afim de melhor discernir os resultados obtidos, foram avaliados os níveis de  $\text{TNF}\alpha$ , uma citocina pró-inflamatória já descrita no modelo de EAE como um importante mediador de resposta Th1 (Juedes et al., 2000), e das quimiocinas CCL2, CCL3, CCL5 e CXCL10 no sobrenadante de extrato cerebral de camundongos EAE referente aos dias 7, 14 e 21 após a indução. Os níveis de  $\text{TNF}\alpha$  no cérebro de animais com EAE aumentaram a partir do dia 14, mantendo-se elevados até o dia 21 (Figura 15a.). Todavia, as quimiocinas CCL2 e CCL5 apresentaram um aumento marcante no dia 14, com uma diminuição no dia 21, quando alcançaram valores próximos aos observados no dia 7. Desta forma, estes resultados acompanharam o mesmo perfil observado quanto ao recrutamento de leucócitos e ao quadro clínico no modelo de EAE estudado (Figura 15b,c).

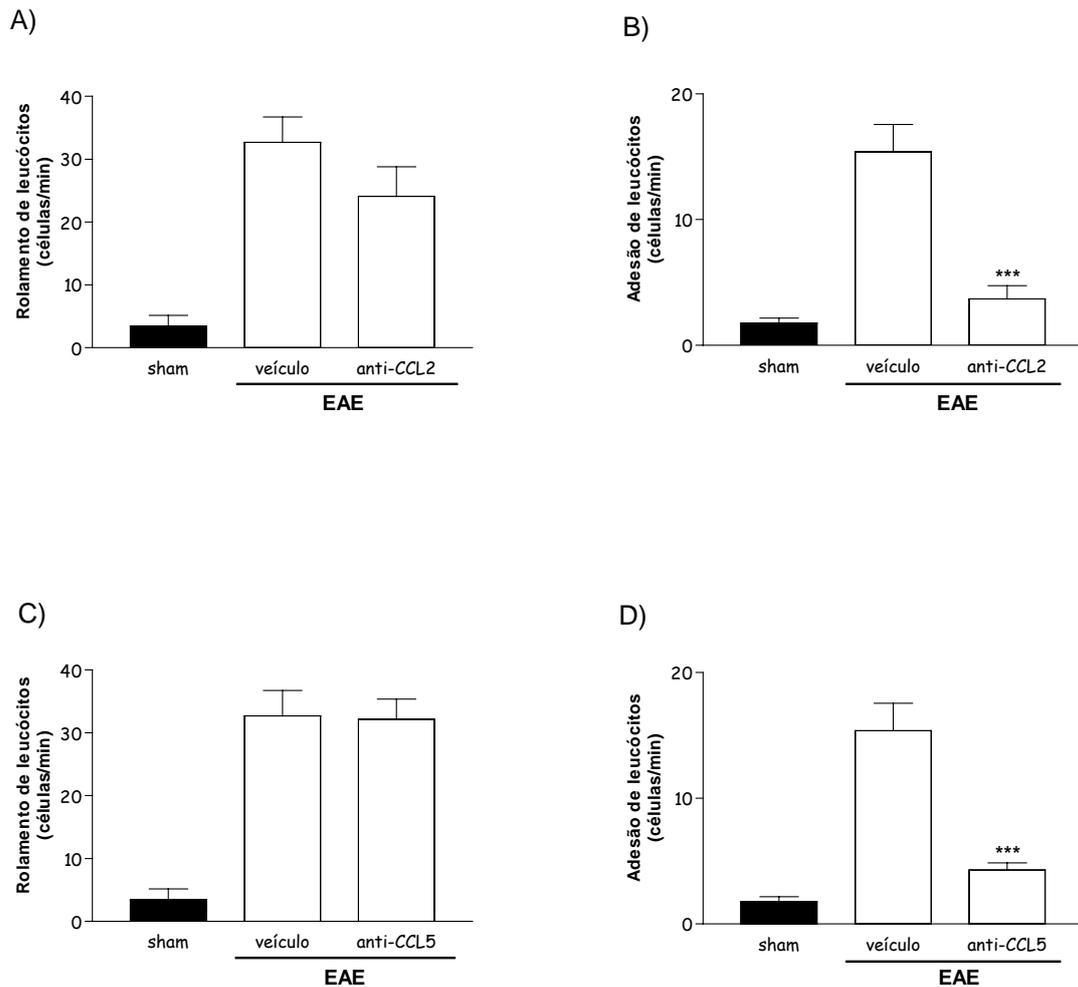
Em contraste, nenhuma diferença foi verificada quanto aos níveis das quimiocinas CCL3 e CXCL10 nos grupos EAE, comparando com o grupo sham (Figura 15d,e).

Visto que as quimiocinas CCL2 e CCL5 poderiam estar desenvolvendo um papel importante durante o recrutamento de células inflamatórias para o SNC no modelo estudado, foi avaliado o papel de cada uma dessas moléculas durante os processos de rolamento e adesão. Os animais com EAE receberam uma injeção i.p. de anticorpo anti-CCL2 ou anti-CCL5, 2 horas antes de realizar o procedimento de microscopia intravital. O bloqueio de CCL2 resultou numa redução significativa de adesão de leucócitos na parede dos vasos da pia-máter, no entanto, a neutralização

desta quimiocina não foi capaz de alterar o processo de rolamento (Figura 16a,b). O mesmo resultado foi observado após o tratamento com anticorpo anti-CCL5, em que uma acentuada redução ocorreu no número de leucócitos aderidos enquanto o rolamento se manteve semelhante ao observado no grupo não tratado (Figura 16c,d).



**Figura 15. Avaliação da produção de citocinas e quimiocinas no cérebro de camundongos com EAE.** Foram incluídos animais com EAE e animais controle (n=5). Os níveis de citocinas e quimiocinas foram medidos em amostras de homogenato de cérebro referentes aos dias 7, 14 e 21 após a imunização, utilizando o método de ELISA para a medida de TNF $\alpha$  (A), CCL2 (B), CCL5 (C), CCL3 (D) e CXCL10 (E). Os resultados foram expressos em pg/100mg de tecido (média  $\pm$  EPM). A análise estatística foi feita pelo teste não-paramétrico ANOVA, considerando significativo P<0,05.



**Figura 16. Análise *in vivo* do efeito do tratamento anti-CCL2 e anti-CCL5 no recrutamento de leucócitos na microvasculatura cerebral de camundongos com EAE.** Camundongos com EAE (n=7/grupo), 14 dias após imunização, foram tratados com anticorpo anti-murino, anti-CCL2 e anti-CCL5, 2 horas antes do procedimento de microscopia intravital, através da contagem do número de leucócitos em rolamento (A,C) e aderidos (B,D) na parede dos vasos da pia-máter. Os resultados foram expressos como no de células/minuto (media  $\pm$  EPM) e o teste não-paramétrico ANOVA indicou: \*\*\*P< 0,001 em relação ao grupo EAE que recebeu PBS 1X como tratamento.

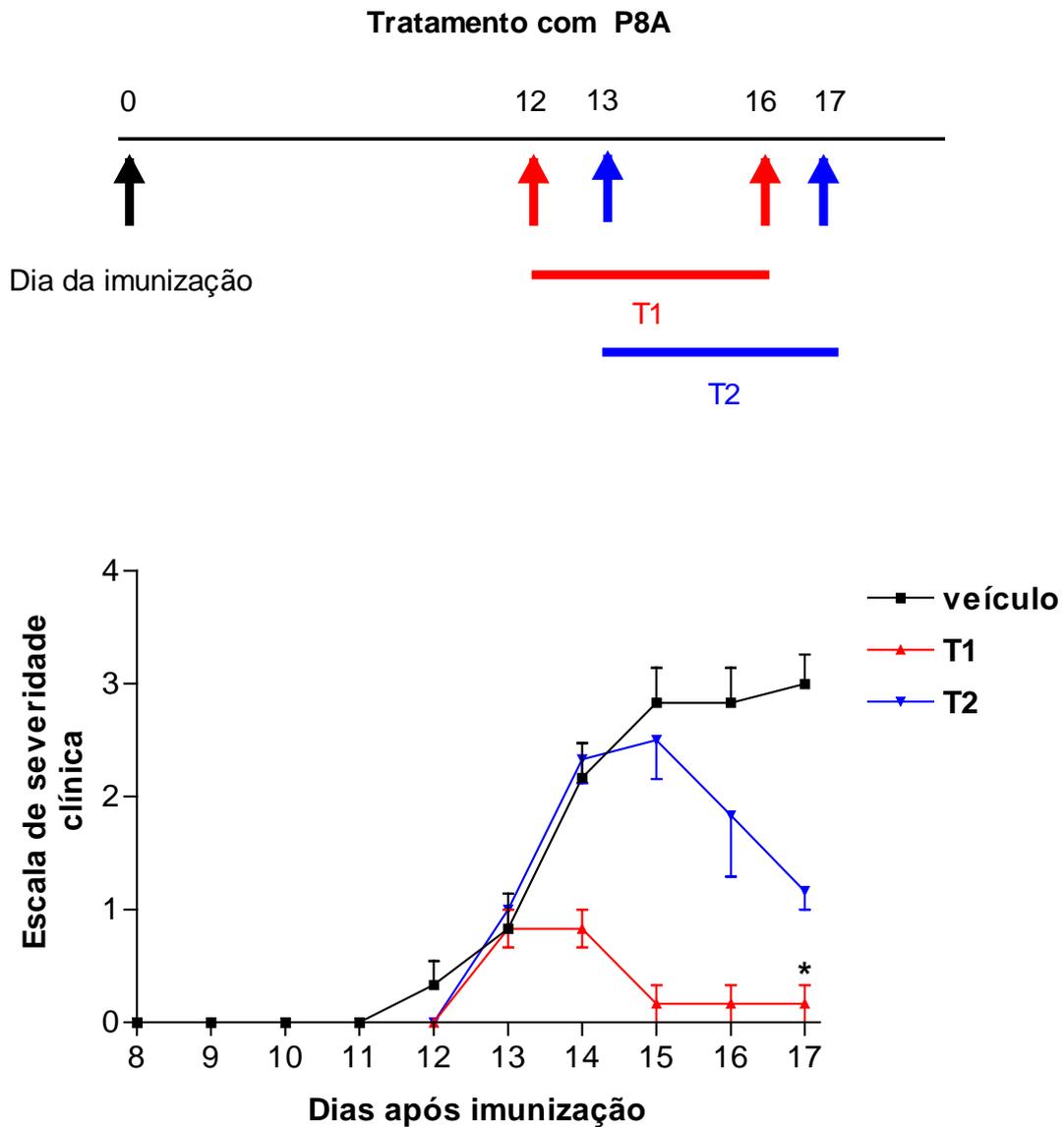
## **4.2. Avaliação do papel da quimiocina CCL2 na EAE a partir do tratamento com a sua proteína mutante P8A**

### **4.2.1. Avaliação do perfil clínico após tratamento com P8A**

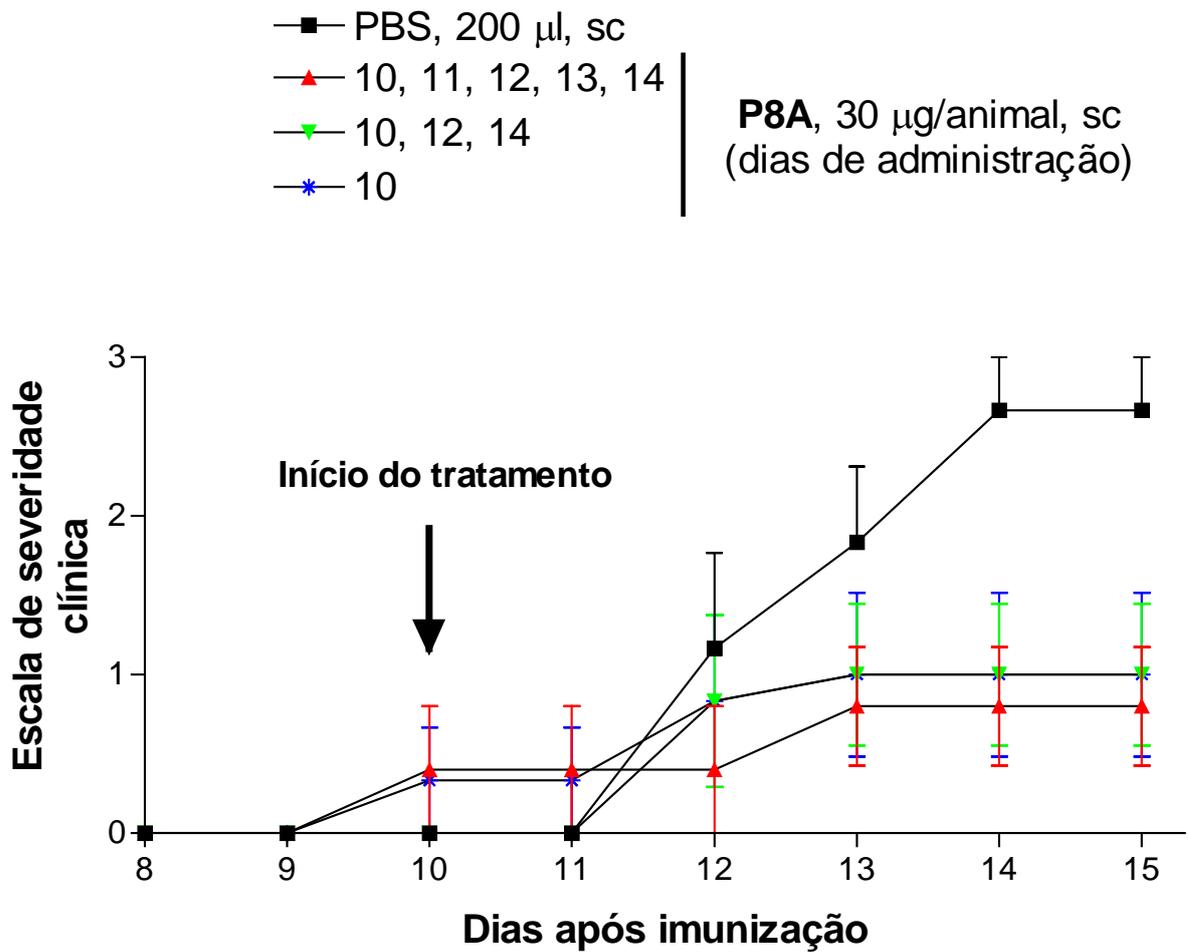
O primeiro protocolo experimental de tratamento foi realizado em dois grupos a fim de avaliar o desenvolvimento clínico da doença. O grupo T1 foi tratado durante cinco dias antes do aparecimento dos sinais clínicos com uma dose de 30µg/dia s.c. Este tratamento mostrou um importante bloqueio na indução da doença (Figura 17). O segundo grupo T2 recebeu a mesma dose durante cinco dias a partir dos primeiros sintomas, mostrando uma discreta redução dos sinais, somente no final do tratamento (Figura 17).

O segundo protocolo experimental foi realizado, incluindo três grupos de tratamento: T1 (dose única), T2 (a cada dois dias) e T3 (dose diária). Os resultados obtidos a partir deste protocolo de tratamento reforçaram a hipótese de uma importante participação da quimiocina CCL2 durante a patogenia da EAE. Visto que a proteína modificada P8A não permite a interação reversível da quimiocina com moléculas de glicosaminoglicanos de matriz extracelular e endotélio, impedindo o processo de dimerização necessário para a ligação da quimiocina CCL2 ao seu receptor. O tratamento diário por cinco dias foi capaz de inibir o desenvolvimento da doença, o que pôde ser observado pelo menor índice de severidade clínica alcançado pelo grupo de animais que recebeu o respectivo tratamento. Uma redução menos marcante na evolução clínica também foi observada nos grupos que receberam dose única e uma dose a cada dois dias da P8A (Figura 18).

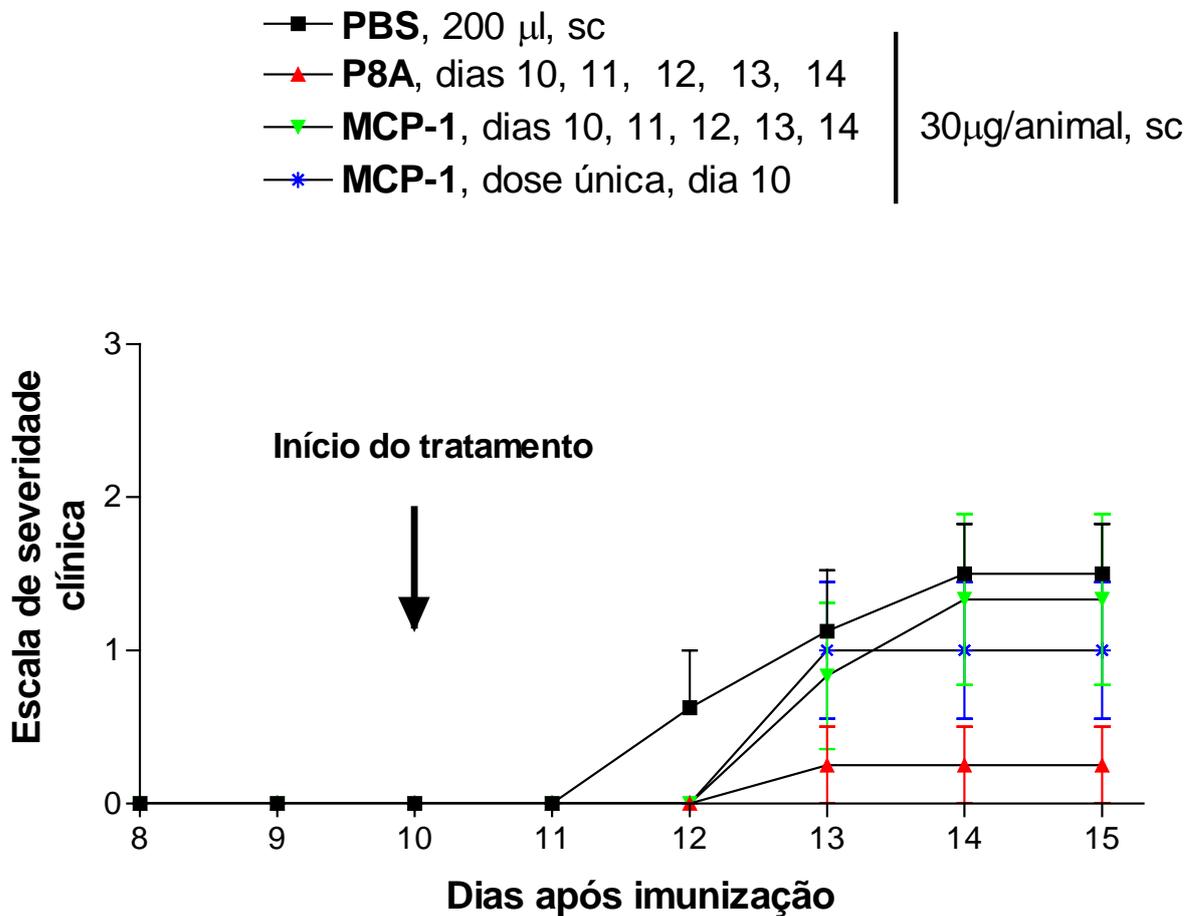
Os resultados obtidos no protocolo 3 mostraram, novamente, que o tratamento com P8A foi capaz de reduzir as manifestações clínicas da doença. Entretanto, a injeção da proteína íntegra de CCL2 não foi capaz de alterar o perfil clínico da doença (Figura 19).



**Figura 17. Efeito da proteína mutante P8A sobre o desenvolvimento clínico do modelo murino de EAE.** Os animais com EAE (N=6/grupo) foram tratados com P8A 30(g/dia s.c, durante 5 dias. O grupo T1 recebeu o tratamento a partir do dia 12 pós-indução, antes do aparecimento dos sinais clínicos (d12-d16) e o grupo T2 a partir do dia 13, quando foram observados os primeiros sinais (d13-d17). Os resultados foram expressos a partir de uma escala de severidade clínica (média ( EPM) e o teste ANOVA foi utilizado para análise estatística, indicando \*P < 0,05, em comparação com o grupo que recebeu o mesmo volume de PBS 1X.



**Figura 18. Avaliação de diferentes tratamentos com a proteína mutante P8A em camundongos com EAE.** Camundongos C57BL/6 (n=6/grupo) foram tratados com P8A, 30(g/dia s.c a partir do 10o dia após a indução da EAE com o peptídeo MOG 35-55. O protocolo foi composto por 3 grupos de animais, T1 (tratado com dose única no dia 10), T2 (tratado a cada dois dias) e o grupo T3 (tratado durante 5 dias a partir do dia 10). Os resultados foram expressos a partir de uma escala de severidade clínica (média ( EPM) e o teste ANOVA foi utilizado para análise estatística.

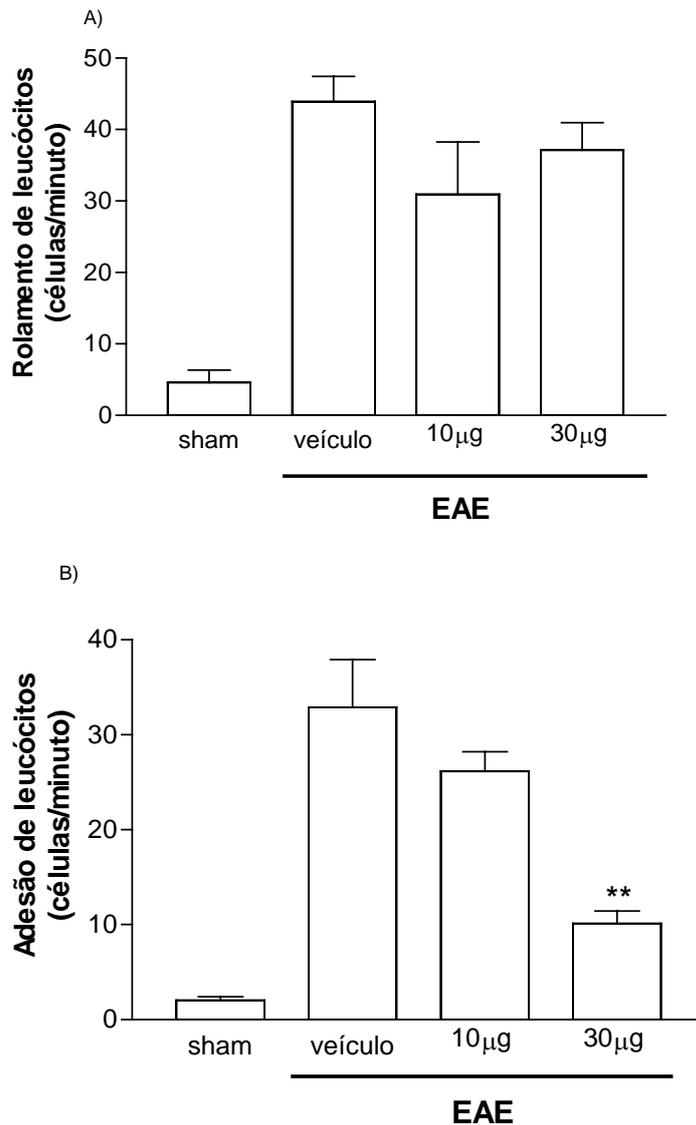


**Figura 19. Avaliação do perfil clínico após tratamento com a quimiocina CCL2 e sua proteína modificada P8A no modelo murino de EAE.** Camundongos C57BL/6 (n=6/grupo) foram tratados durante 5 dias a partir do 10<sup>o</sup> dia após imunização, com P8A (T1) e CCL2/MCP1 (T2), 30 $\mu$ g/dia s.c, outro grupo recebeu uma dose única de 30 $\mu$ g s.c (T3) no dia 10. Os resultados foram expressos a partir de uma escala de severidade clínica (média  $\pm$  EPM) e o teste One-Way ANOVA foi utilizado para análise estatística.

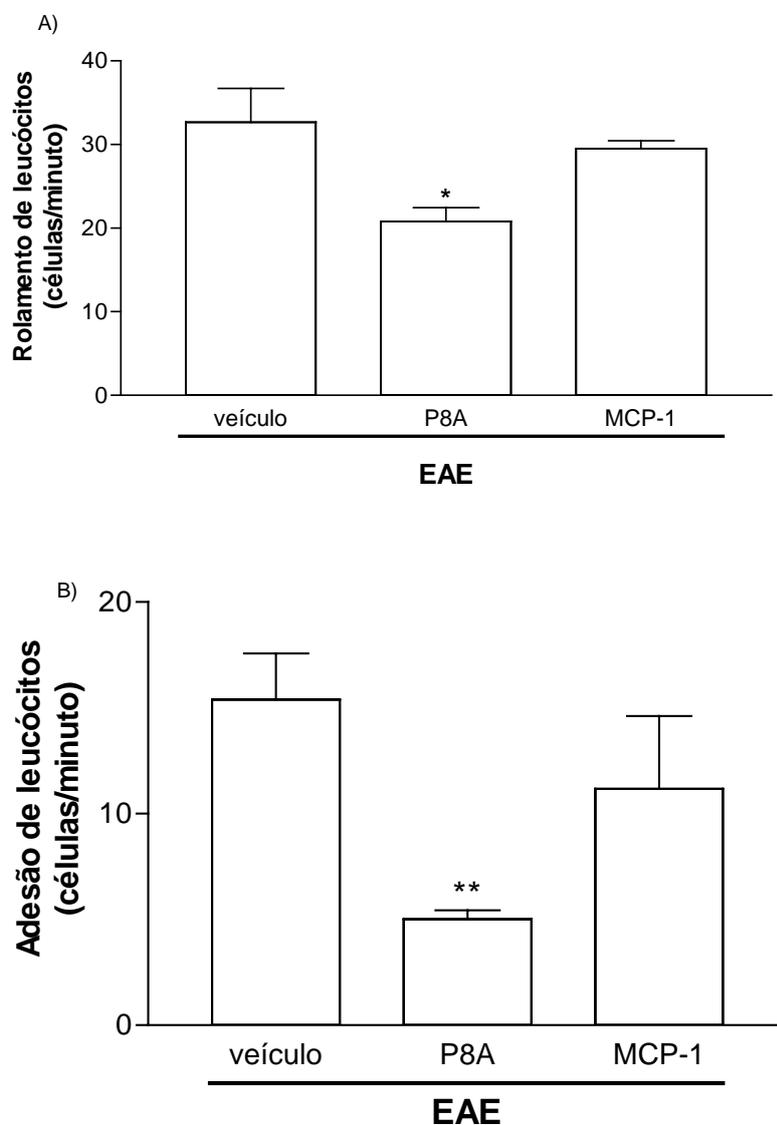
#### **4.2.2. Recrutamento de leucócitos na microvasculatura cerebral após tratamento com P8A**

As quimiocinas são capazes de controlar e direcionar a migração celular. E, a imobilização dessas moléculas quimiotáticas a partir da ligação com glicosaminoglicanos (GAGs) de matriz extracelular e superfície endotelial, tem sido sugerida como etapa fundamental desse processo (Proudfoot *et al.*, 2003).

Na intenção de avaliar o recrutamento de leucócitos na microvasculatura cerebral de animais com EAE a partir do bloqueio de atividade da quimiocina CCL2, os animais com EAE receberam uma dose única de 30µg (via s.c) da proteína P8A uma hora antes do procedimento de microscopia intravital, a qual foi capaz de provocar uma diminuição no processo de adesão de leucócitos na parede dos vasos da pia-máter. Entretanto, nenhuma diferença foi observada em relação ao processo de rolamento (Figura 20a,b). O mesmo protocolo foi realizado, incluindo a proteína íntegra de CCL2. E, novamente o tratamento com a proteína mutante P8A promoveu uma diminuição do processo de adesão de leucócitos, sem alterar o evento de rolamento. Entretanto, nenhuma diferença foi observada após o tratamento com CCL2 (Figura 21a,b).



**Figura 20. Efeito da proteína mutante P8A sobre o recrutamento de leucócitos na microvasculatura cerebral de animais com EAE.** No 14<sup>o</sup> dia após a imunização com MOG 35-55, camundongos EAE (n=6/grupo) foram tratados com 10µg e 30µg i.p de P8A uma hora antes do procedimento de microscopia intravital. Foram avaliados *in vivo* os eventos de rolamento (A) e adesão (B) de leucócitos nos vasos da pia-máter. E, os resultados foram expressos em número de células/minuto (média ± EPM). A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA não-paramétrico, indicando \*P < 0,05 em comparação com o grupo EAE tratado com PBS.

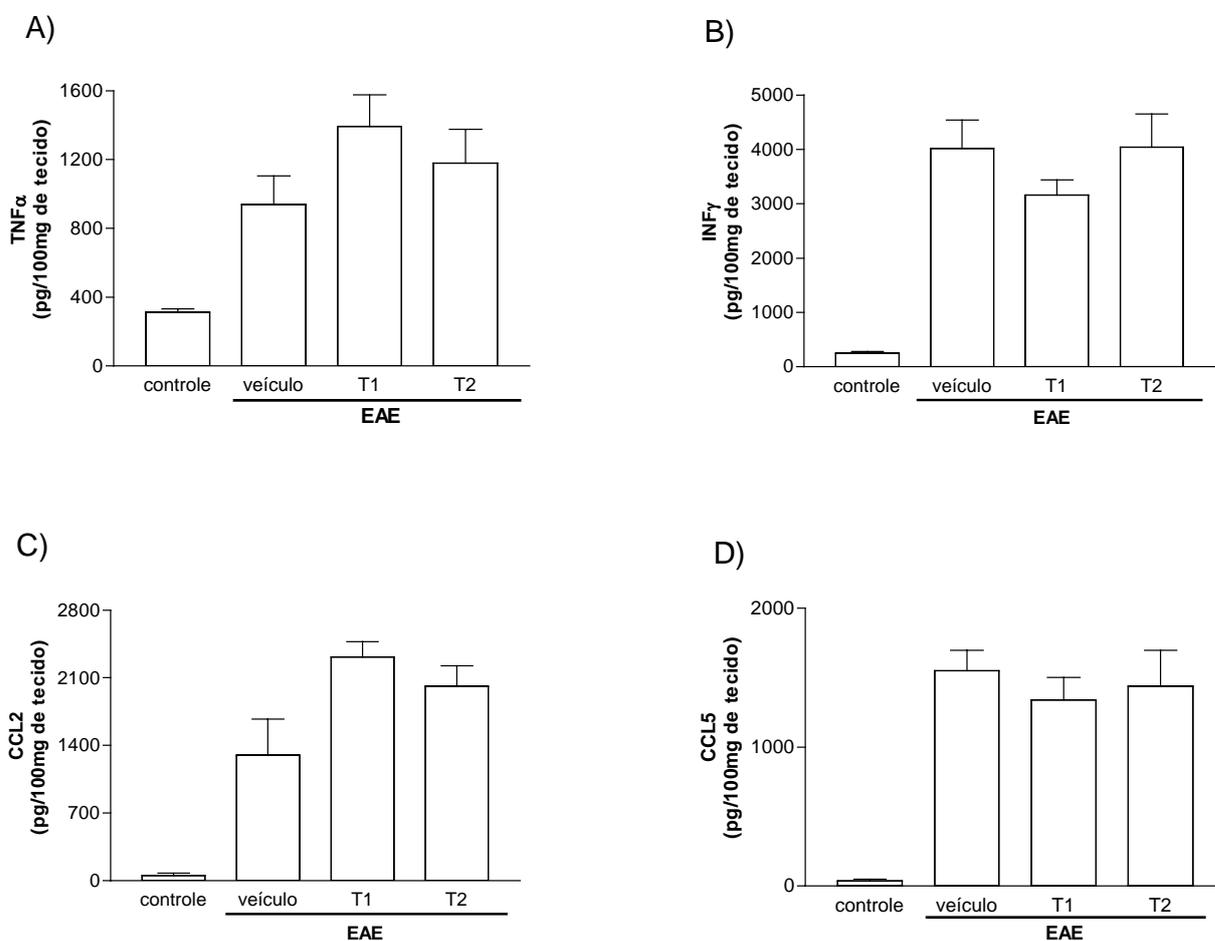


**Figura 21. Avaliação *in vivo* do recrutamento de leucócitos na microvasculatura cerebral de camundongos com EAE a partir do tratamento com CCL2/MCP-1 e P8A.** Os animais foram tratados com P8A (T1) e CCL2 (T2), 30µg/dia i.p., 1 hora antes do procedimento de microscopia intravital. Foram avaliados os eventos de rolamento (A) e adesão celular (B) nos vasos da pia-máter. Os resultados foram expressos em no de células/minuto (média ± EPM) e o teste One-Way ANOVA foi utilizado para análise estatística, indicando \*\*P < 0,01 em comparação com o grupo que recebeu o mesmo volume de PBS 1X.

#### **4.2.3. Perfil de citocinas e quimiocinas a partir do tratamento com P8A**

Os resultados obtidos nos ensaios anteriores incentivaram uma posterior análise de citocinas e quimiocinas participantes na imuno-modulação de diferentes processos inflamatórios, como  $TNF\alpha$ ,  $INF\gamma$ , CCL2 e CCL5 (Juedes *et al.*, 2000; dos Santos *et al.*, 2005). As análises foram realizadas no extrato cerebral de camundongos com EAE tratados com 30 $\mu$ g/animal s.c de P8A durante 5 dias antes (T1) e depois (T2) do aparecimento dos sinais clínicos, conforme protocolo 1 descrito anteriormente.

Os resultados mostraram que o bloqueio da atividade da quimiocina CCL2 sobre o endotélio vascular produzido pelo tratamento com P8A não foi capaz de alterar a produção das citocinas  $TNF\alpha$  e  $INF\gamma$  e, das quimiocinas CCL2 e CCL5 quando comparada com o grupo EAE WT (Figura 22).



**Figura 22. Efeito da proteína mutante P8A na produção de citocinas e quimiocinas no modelo murino de EAE.** A produção de citocinas e quimiocinas foi avaliada em amostras de homogenato de cérebro pelo método de ELISA (n=5/grupo), a partir do tratamento com P8A 30 $\mu$ g/dia s.c. O ensaio foi realizado nos grupos controle, EAE tratado com PBS, T1 (tratado entre os dias 10 e 14) e o grupo T2 (tratado entre os dias 13 e 17), após indução da doença. Foram avaliadas as moléculas de TNF $\alpha$  (A), IFN $\gamma$  (B), CCL2 (C) e CCL5 (D). O teste One-way ANOVA foi utilizado para análise estatística, indicando \*P < 0,05, comparando com o grupo EAE veículo.

## PARTE II

Avaliação da participação dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> da bradicinina no processo de recrutamento de leucócitos na microvasculatura cerebral de camundongos com EAE induzidos com MOG<sub>35-55</sub> , assim como no desenvolvimento da doença.

### **4.3. Papel dos receptores de bradicinina, B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> na EAE**

#### **4.3.1. Avaliação clínica do modelo de EAE em animais knockout para os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>**

O monitoramento clínico da EAE nos grupos WT, B<sub>1</sub><sup>-/-</sup>, B<sub>2</sub><sup>-/-</sup> foi realizado diariamente durante 28 dias após a indução da doença. De acordo com a tabela de severidade clínica mencionada anteriormente, os resultados observados indicaram um quadro similar entre os grupos. Os sinais clínicos apareceram a partir do dia 12 após a imunização, com um pico de evidência no dia 14, mantendo-se estatisticamente estáveis até o dia 28 (Figura 23a). O desenvolvimento da doença foi acompanhado com uma perda de peso corporal em todos os grupos estudados (Figura 23b).

#### **4.3.2. Análise Histopatológica**

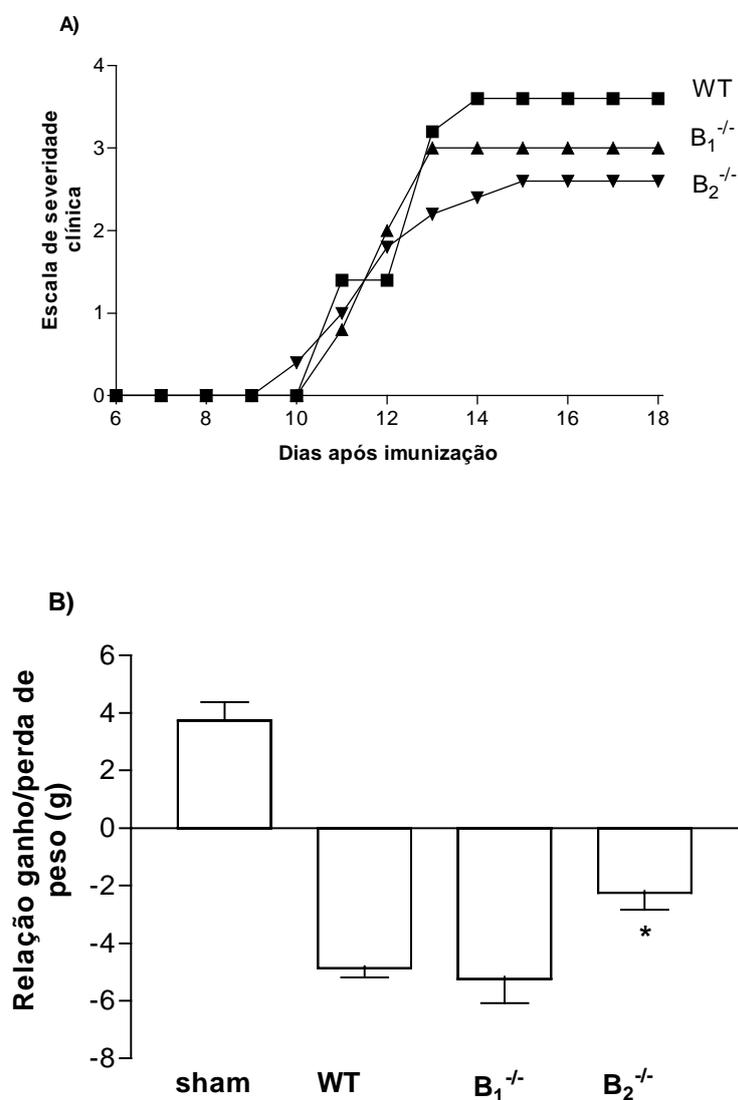
A análise histológica foi realizada em cortes transversais do cérebro, medula espinhal e cerebelo, com enfoque nas regiões perivasculares das meninges e do parênquima cerebral. Fizeram parte do estudo os grupos de animais: WT, B<sub>1</sub><sup>-/-</sup>, B<sub>2</sub><sup>-/-</sup> com EAE 14 dias após indução e animais saudáveis.

Os animais EAE WT apresentaram um intenso infiltrado inflamatório na região perivascular das meninges, que se estende pelo tecido neural, sendo composto, principalmente por mononucleares. Na medula espinhal deste grupo também foi observado um processo inflamatório característico do modelo, atingindo principalmente a substância branca e a região das meninges. Entretanto, no cerebelo foi evidenciado um discreto infiltrado inflamatório (Figura 24 a,b,c). Nos animais

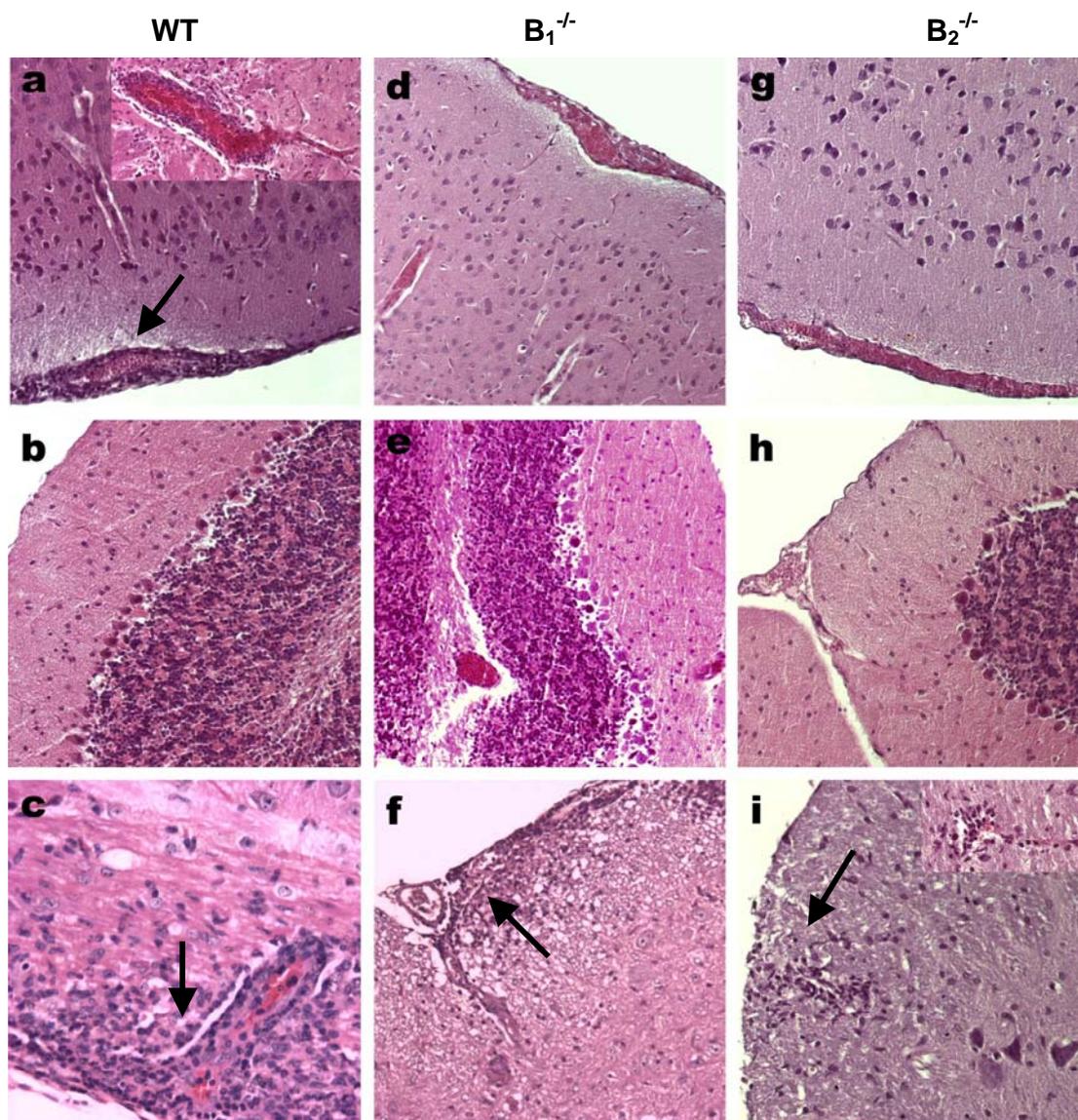
knockout  $B_1^{-/-}$ , foi observada a presença de células mononucleares ao redor dos vasos da pia-máter, formando um infiltrado celular muito discreto. Enquanto o tecido neural se apresentou totalmente preservado quando comparado com os animais WT EAE (Figura 24d). Contudo, o grupo  $B_2^{-/-}$  não apresentou foco inflamatório nos vasos da pia-máter, assim como no parênquima (Figura 24g).

Ao avaliar os cortes referentes à medula espinhal dos grupos  $B_1^{-/-}$  e  $B_2^{-/-}$ , foi evidenciado uma lesão inflamatória similar ao quadro apresentado pelos animais WT EAE, com intenso infiltrado inflamatório na substância branca (Figura 24c,f,i).

Em relação ao cerebelo, foi evidenciada uma lesão inflamatória com um discreto infiltrado mononuclear o grupo EAE WT. Enquanto que os grupos  $B_1^{-/-}$  e  $B_2^{-/-}$  apresentaram total preservação do tecido (Figura b,e,h).



**Figura 23. Avaliação do perfil clínico do modelo de EAE em animais knockout para os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> da bradicinina.** Camundongos C57BL/6 X sv129 B<sub>1</sub><sup>-/-</sup>, B<sub>2</sub><sup>-/-</sup> e WT com EAE (n=7/grupo) foram avaliados durante 22 dias, após a indução com peptídeo MOG 35-55, quanto aos sinais clínicos da doença (A) e quanto à perda de peso corporal (B). Os resultados referentes ao perfil clínico foram expressos baseados numa escala de severidade clínica, previamente descrita (média ± EPM) e, quanto ao peso foi indicada perda e ganho em gramas por grupo (média ± EPM). O teste One-Way ANOVA foi utilizado, indicando \*P < 0,05 para o grupo B<sub>2</sub><sup>-/-</sup>, comparando com o grupo WT (A e B).

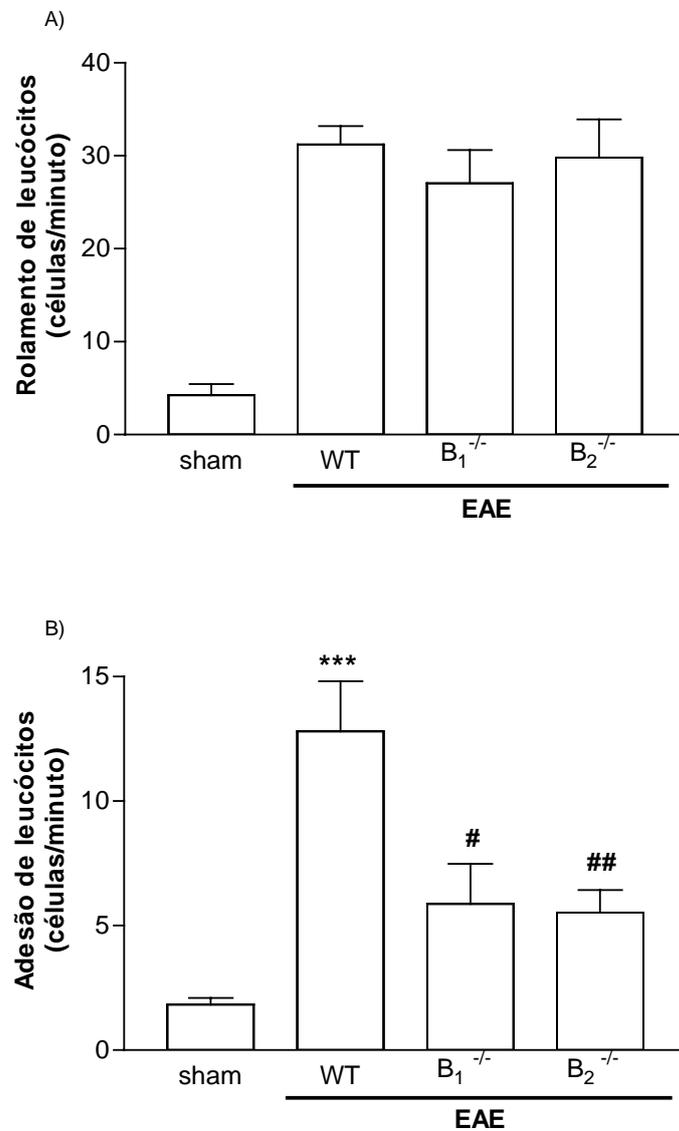


**Figura 24. Análise histopatológica no cérebro, cerebelo e medula espinhal de animais knockout para os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> da bradicinina com EAE.** A análise foi realizada a partir de cortes referentes ao cérebro (A,D, G), cerebelo (B, E, H) e medula espinhal (C, F, I) corados com hematoxilina e eosina (H&E), dos respectivos grupos. Uma análise qualitativa foi realizada quanto à presença de infiltrado inflamatório nas regiões perivasculares da pia-máter e do parênquima cerebral.

#### **4.3.3. Papel dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> nos eventos de rolamento e adesão de leucócitos na microvasculatura cerebral.**

Para este estudo, foi utilizada a técnica de microscopia intravital para visualização dos vasos da pia-máter e contagem do número de leucócitos em rolamento e aderidos na parede dos vasos. Foram incluídos os grupos WT, B<sub>1</sub><sup>-/-</sup> e B<sub>2</sub><sup>-/-</sup> com EAE 14 dias após indução e animais saudáveis. O grupo controle utilizado constituiu de animais B<sub>1</sub>/B<sub>2</sub><sup>+/+</sup>, uma vez que os animais B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub><sup>-/-</sup>, sem EAE, apresentaram um perfil similar quanto aos parâmetros de rolamento e adesão. E, a preservação do tecido nervoso foi confirmada pela análise histológica.

A deleção do gene para o receptor B<sub>1</sub> não afetou o processo de rolamento de leucócitos quando comparado com os animais EAE WT. O mesmo resultado foi observado para os animais que não expressavam o gene para o receptor B<sub>2</sub>. Entretanto, uma marcante diminuição ocorreu no número de leucócitos aderidos na parede dos vasos da pia-máter, um resultado observado tanto para os animais B<sub>1</sub><sup>-/-</sup> quanto para os animais B<sub>2</sub><sup>-/-</sup> com a doença (Figura 25a,b).

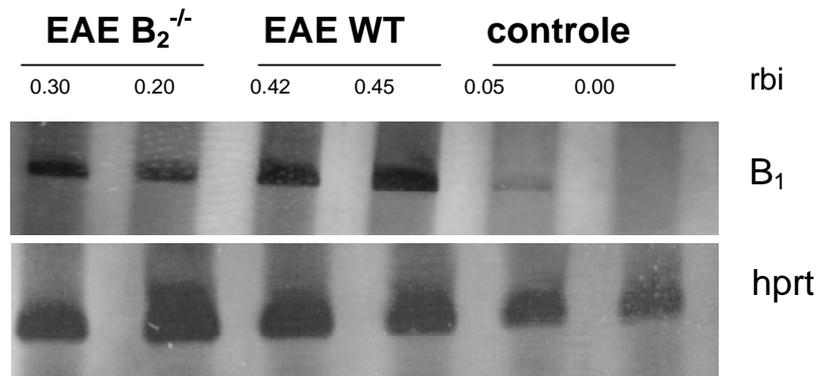


**Figura 25. Análise *in vivo* do recrutamento de leucócitos na microvasculatura cerebral de animais knockout para os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> da bradicinina.** A análise foi realizada, utilizando a técnica de microscopia intravital, através da contagem do número de leucócitos em rolamento (A) e aderidos (B) na parede dos vasos da pia-máter dos animais (n=6/ grupo), no 14º dia após a indução. Os resultados foram expressos como nº de células/minuto (media ± EPM), e análise estatística foi realizada pelo teste não-paramétrico ANOVA, indicando: \*\*\*P< 0,001 para os diferentes grupos comparados ao grupo sham e ##P<0,01 para os grupos knockout comparados com os animais WT.

#### **4.3.4. Expressão de RNAm para o receptor B<sub>1</sub> da bradicinina no extrato de cérebro**

O receptor B<sub>1</sub> tem sido demonstrado como uma molécula cuja expressão é induzida, principalmente, por um estímulo inflamatório, enquanto que o receptor B<sub>2</sub> é expresso de forma constitutiva (Regoli *et al*, 1998; Marceau *et al*, 2004). Os resultados analisados anteriormente permitem sugerir uma possível participação do receptor B<sub>2</sub> na regulação da ativação do receptor B<sub>1</sub>. Portanto, foi avaliada a expressão do receptor B<sub>1</sub> no cérebro de camundongos saudáveis, animais EAE WT e animais knockout para o receptor B<sub>2</sub>, utilizando a técnica de RT-PCR.

O desenvolvimento de uma resposta inflamatória crônica no SNC contou com um marcante aumento da expressão do receptor B<sub>1</sub> ( $27.55 \pm 3.471$ ) no homogenato de cérebro durante o período de caracterização clínica e histológica da EAE, quando comparado com o grupo controle ( $13.83 \pm 3.365$ ). Entretanto, os animais knockout para o receptor B<sub>2</sub>, embora, tivessem apresentado a doença, mostrou menor expressão do receptor B<sub>1</sub> ( $19.48 \pm 2.886$ ) (Figura 26).



**Figura 26. Avaliação da expressão do receptor B<sub>1</sub> no extrato cerebral de camundongos com EAE.** Foi utilizada a técnica de RT-PCR para avaliar a expressão do receptor B<sub>1</sub> em homogenato de cérebro de camundongo EAE WT, EAE B<sub>2</sub><sup>-/-</sup> e controle, referente ao 14º dia após a indução. A análise semi-quantitativa foi realizada a partir do gene constitutivo HPRT e o resultado foi expresso em gel de poliacrilamida corado em solução de nitrato de prata.

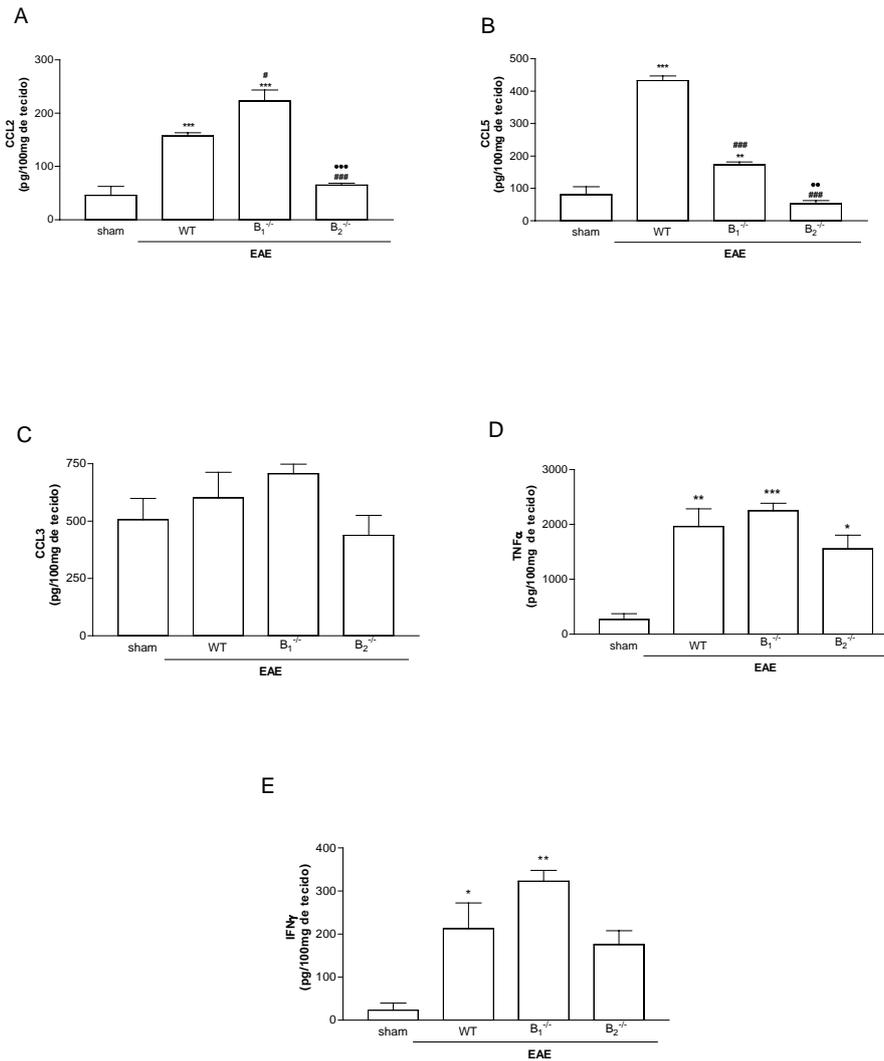
#### **4.3.5. Papel dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> na produção de citocinas e quimiocinas no extrato de cérebro**

Os mecanismos de regulação das etapas que consistem o processo de migração celular durante uma resposta inflamatória, envolvem diferentes mediadores, como as moléculas de adesão e as quimiocinas. Foi mostrado, neste trabalho, a participação dos receptores de bradicinina no controle da adesão de leucócitos na microvasculatura cerebral de camundongos com EAE, um evento que antecede a transmigração celular para o tecido inflamado. Para melhor entender o papel desses receptores sobre outros mediadores inflamatórios no modelo estudado, foi realizada a medida dos níveis de importantes citocinas e quimiocinas nos animais WT, e 14 dias após indução e animais sham, utilizando a técnica de ELISA em extrato de cérebro.

O nível de TNF $\alpha$ , importante citocina pró-inflamatória, se manteve alto nos animais B<sub>2</sub><sup>-/-</sup>, próximo do nível encontrado para os animais WT, quando comparado com o grupo sham. Quanto à molécula de IFN $\gamma$ , o nível diminuiu apenas quando comparado ao B<sub>1</sub><sup>-/-</sup>.

Em relação às citocinas quimiotáticas, a molécula CCL2 apresentou um aumento acentuado para os animais B<sub>1</sub><sup>-/-</sup>. Enquanto os animais B<sub>2</sub><sup>-/-</sup> apresentaram uma diminuição. Entretanto, o nível de CCL5 diminuiu para os grupos B<sub>1</sub><sup>-/-</sup> e B<sub>2</sub><sup>-/-</sup>, quando comparados com o grupo WT. Em relação à molécula de CCL3 nenhuma diferença foi observada entre os grupos. A partir destes dados é possível indicar o CCL5 como um importante mediador inflamatório durante o desenvolvimento do

modelo de EAE. Porém, o mecanismo pelo qual a bradicinina pode estar regulando a ação e/ou a expressão desta quimiocina ainda requer outros estudos.



**Figura 27. Avaliação do papel dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> da bradicinina na regulação da produção de citocinas e quimiocinas no modelo EAE.** A produção de citocinas e quimiocinas foi avaliada em homogenato de cérebro de animais EAE WT, B<sub>1</sub><sup>-/-</sup>, B<sub>2</sub><sup>-/-</sup> e controle (n=6/grupo). As amostras foram referentes ao dia 14 após indução da doença. Os níveis de CCL2 (A), CCL5 (B), CCL3 (C), TNFα (D) and IFNγ (E) foram medidos pelo método de ELISA. Os resultados foram expressos em pg/100mg de tecido (média ± EPM) e o teste One-way ANOVA foi utilizado para análise de significância, indicando: \*P<0.05, comparando com o grupo sham; #P<0.05 em relação ao grupo WT e \*P<0.05 em relação ao grupo B<sub>1</sub><sup>-/-</sup>.

## DISCUSSÃO

## 5. DISCUSSÃO

A migração de leucócitos ativados da circulação sistêmica para o SNC constitui um dos pontos cruciais na patogenia da EM, desencadeando uma resposta imune específica contra componentes da bainha de mielina (Prineas & Wright, 1978; Adams *et al.*, 1989; Hafler, 2004). Estas células infiltrantes, principalmente células T, células B e macrófagos são capazes de amplificar a resposta inflamatória, com a ativação de células residentes, como astrócitos e microglia, levando a destruição da mielina e lesão axonal (Compston & Coles, 2002; Hafler, 2004).

O modelo murino de EAE, há décadas, tem sido utilizado pela similaridade no padrão de resposta inflamatória, assim como, a formação de um infiltrado celular mediado por células T CD4+ no parênquima cerebral (Linington *et al.*, 1988; Linington *et al.*, 1992).

A resposta inflamatória na EAE está associada à liberação de importantes mediadores inflamatórios, como citocinas, moléculas de adesão e quimiocinas. As quimiocinas e seus receptores exercem importante papel durante o processo de migração celular para o sítio de inflamação. Além disso, a ativação de sistemas acoplados à proteína G atribui a essas moléculas outras funções biológicas, como apoptose, regulação da resposta imune e outras (Baggiolini, 1998; Weber, 2001; MacKay, 2001; Mahad & Ransohoff, 2003).

Portanto, neste estudo foi utilizada a técnica de microscopia intravital para avaliação *in vivo* da participação das quimiocinas durante as etapas de rolamento e adesão na microvasculatura cerebral de camundongos com EAE. A visualização da interação de leucócitos com o endotélio em vasos inflamados tem revelado que leucócitos, inicialmente, rolam ao longo da parede do vaso e, após uma firme

aderência, transmigram através do endotélio (Kerfoot & Kubes, 2002). E os eventos de rolamento e adesão de leucócitos na circulação cerebral são aumentados após tratamento com  $TNF\alpha$  (Carvalho-Tavares *et al.*, 2000).

Os primeiros resultados indicaram um aumento no número de leucócitos em rolamento e aderidos nos vasos da pia-máter nos dias 7, 14 e 21 após a indução da EAE. Contudo, o rolamento e adesão foram maiores no dia 14, correlacionando com o pico de manifestação clínica e inflamação no SNC. Esses resultados são consistentes com a idéia de que a migração de células imunes para o tecido cerebral constitui um processo relevante para o estabelecimento e progressão da doença.

O recrutamento de leucócitos em diferentes condições inflamatórias depende da expressão de moléculas de adesão pelos leucócitos e de seus ligantes nas células endoteliais (Tang *et al.*, 1996; Kerfoot & Kubes, 2002; James *et al.*, 2003). Embora os mecanismos que regulam esta entrada de leucócitos no SNC ainda não estejam totalmente elucidados, trabalhos anteriores indicam um importante papel para as quimiocinas na expressão de moléculas de adesão, facilitando o processo de migração (Tanaka *et al.*, 1993; Babcock & Owens, 2003).

Isso motivou a análise dos níveis de quimiocinas no extrato de cérebro de camundongos com EAE, nos dias 7, 14 e 21 após indução. Os estudos revelaram um aumento marcante das quimiocinas CCL2 e CCL5 no dia 14, sugerindo que estas moléculas estejam desempenhando um papel regulador durante o recrutamento de leucócitos no pico da doença. Corroborando com esses dados, no modelo de EAE em camundongos SJL/J induzidos com PLP, a expressão de CCL2 está associada com o aparecimento dos sintomas da doença (Glabinski *et al.*, 1995). Além disso,

tratamento com anti-CCL2 foi capaz de inibir a indução da EAE (Mahad & Ransohoff, 2003).

Desta forma, para melhor compreender o papel das quimiocinas CCL2 e CCL5 no recrutamento de leucócitos para o parênquima cerebral, foi avaliado *in vivo* os eventos de rolamento e adesão nos vasos da pia-máter após o tratamento dos animais com EAE com anticorpos específicos anti-CCL2 e anti-CCL5 duas horas antes do procedimento de microscopia intravital. Os resultados demonstraram com clareza que o bloqueio dessas moléculas foi capaz de reduzir a adesão de leucócitos na parede dos vasos, entretanto, sem alterar o perfil de rolamento dessas células.

Visto que a adesão é uma etapa essencial para que ocorra a transmigração celular através do endotélio para o sítio de inflamação, esses dados sugerem um importante papel das moléculas de CCL2 e CCL5 no desenvolvimento da EAE. Entretanto, ainda é preciso esclarecer por qual mecanismo o tratamento foi capaz de inibir, quase que totalmente, o processo de adesão mesmo na presença elevada de uma das duas quimiocinas. Uma hipótese seria baseada no fato de que os níveis de produção de determinadas quimiocinas, incluindo CCL2 e CCL5, não sejam suficientes para que sozinhas regulem o processo, sendo requerido um mecanismo de sinergismo entre os sistemas de ativação acoplados à proteína G. Logo, a neutralização de uma molécula pode levar a inibição do influxo de leucócitos. Um recente estudo mostrou que, num modelo de desmielinização induzido por vírus da hepatite-MHV, o tratamento com anti-CCL5 foi capaz de reduzir a gravidade do processo e acúmulo de macrófagos dentro do SNC (Glass *et al.*, 2004).

A quimiocina CCL2, apontada como uma molécula efetiva durante a infiltração de células mononucleares para o SNC em diferentes condições inflamatórias, tem

sido associada com a alteração da permeabilidade da BHE. Cultura de células endoteliais da microvasculatura cerebral tratada com CCL2 mostrou uma diminuição da expressão de caveolina, uma proteína associada às “tight junctions” presentes na BHE. Portanto, essas evidências sugerem que a CCL2 possa induzir uma alteração na estrutura molecular da BHE, promovendo uma maior permeabilidade (Song & Pachter, 2004).

As quimiocinas são moléculas pleiotrópicas e medeiam funções além do processo quimiotático, incluindo hematopoiese, ativação de células T, co-estimulação, produção de citocinas (Elholy *et al.*, 2005). Estudo recente demonstrou que camundongo transgênico, expressando constitutivamente níveis mais baixos da quimiocina CCL2 no SNC, sob o controle do gene promotor da proteína GFAP, desenvolveu uma forma mais branda da doença (Elholy *et al.*, 2005). Além da participação durante o processo de transmigração pela BHE, as quimiocinas também controlam a migração de células T, monócitos e microglia dentro do parênquima cerebral (Mahad *et al.*, 2005).

Trabalho recente demonstrou a expressão do receptor CCR2 em astrócitos de rato Lewis com EAE no pico da doença (Jee *et al.*, 2002), o que reforça a hipótese da participação da quimiocina CCL2 não apenas no início da doença, mas durante a amplificação da resposta inflamatória no SNC responsável pela lesão desmielinizante no modelo da EM.

Além disso, diferentes estudos já demonstraram a presença das quimiocinas CXCL10, CCL5, CCL3 e CCL2 nas lesões cerebrais e no fluido cerebrospinal de pacientes com EM (Balasshov *et al.*, 1999; Sorensen *et al.*, 1999; Trebst & Ransohoff, 2001; Mahad & Ransohoff, 2003; Glass *et al.*, 2004; Moreira *et al.*, 2006a,2006b).

Neste trabalho, foi observado que a concentração da quimiocina CXCL10 não foi diferente do grupo controle, sugerindo que esta não exerça papel importante no modelo de inflamação estudado. E, corroborando com este dado, Klein e colaboradores, mostraram que a deleção gênica de CXCL10 não alterou a gravidade e os achados histopatológicos da EAE (Klein *et al.*, 2004). Poucos trabalhos têm sugerido que CCL3 seja importante durante a indução da EAE em camundongo (Karpus *et al.*, 1995; Sorensen *et al.*, 1999; Trebst & Ransohoff, 2001). Entretanto, neste trabalho não foi observado aumento na produção de CCL3. Como CCL3 também é importante para a indução de resposta imune do tipo Th1 (Babcock & Owens, 2003), os dados encontrados podem sugerir que o papel dessa quimiocina na EAE seja exercido em etapas precedentes ao recrutamento de leucócitos para o cérebro.

Vale ressaltar que os receptores de quimiocinas são capazes de interagir com diferentes quimiocinas. O receptor CCR1 além de ser expresso por diferentes tipos celulares, como neutrófilos, monócitos, linfócitos e eosinófilos, pode interagir com as quimiocinas CCL3, CCL5, CCL7 (Rot & Andrian, 2004). Além das quimiocinas, o modelo de inflamação crônica estudado é regido também pela participação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-2, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  (Martin *et al.*, 1998; Selmaj & Raine, 1998; Kieseier *et al.*, 1999). A produção de TNF $\alpha$  observada no tecido nervoso do modelo estudado sugere sua participação em manter uma resposta inflamatória. Desta forma, leucócitos ativados dentro do SNC seriam capazes de ativar outras populações celulares e induzir mais produção de TNF $\alpha$  e, conseqüente

produção de mais moléculas de adesão (Carvalho-Tavares *et al.*, 2000), e quimiocinas, como CCL2 (Juedes *et al.*, 2000), o que aumentaria o influxo celular.

A função quimiotática das quimiocinas tem sido atribuída a mecanismos imprescindíveis como a ligação à GAGs e, conseqüente oligomerização (Kuschert *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 2004). Trabalhos mostram que CXCL8, CCL2, CCL3 e CCL5 se ligam a cultura de células endoteliais, principalmente, por mecanismos dependentes de GAGs (Hoogewerf *et al.*, 1997; Kuschert *et al.*, 1999). Tem sido proposto que leucócitos rolam ao longo do endotélio pela sua interação com moléculas de selectinas. Posteriormente, as quimiocinas são apresentadas sobre moléculas de GAGs na superfície endotelial e, então, interagem de forma específica com o seu receptor expresso na superfície dos leucócitos (Pease & Williams, 2006).

Para melhor descrever a importância da quimiocina CCL2 durante o recrutamento de células inflamatórias para o SNC no modelo de EAE em camundongos, após indução da doença, os animais foram tratados com uma proteína mutante P8A, referente à quimiocina CCL2. A molécula de P8A apresenta uma mutação que permite sua interação com receptor de CCL2 sem promover uma sinalização intracelular *in vivo*, competindo com moléculas de CCL2. Outra sugestão seria a sua ligação de forma reversível a moléculas de GAGs na superfície do endotélio (Paavola *et al.*, 1998). Portanto, a molécula de P8A tem sido analisada pela sua função inibidora da atividade da quimiocina CCL2, embora, o mecanismo pelo qual essa inibição é promovida ainda não tenha sido esclarecido.

Análise *in vitro* mostrou que a proteína modificada P8A interage com receptor específico sob a forma monomérica e, esta interação é capaz de promover uma sinalização intracelular. Foi evidenciado que a ligação entre P8A e o receptor CCR2

estimula a quimiotaxia, inibe adenil ciclase e estimula o influxo de cálcio, entretanto *in vivo* esta sinalização não acontece (Paavola *et al.*, 1998).

O tratamento com P8A 1 hora antes do procedimento de microscopia intravital promoveu uma diminuição no número de células aderidas, sem alteração no evento de rolamento. A partir dos resultados obtidos quanto ao recrutamento de leucócitos na microvasculatura cerebral em animais com EAE tratados com P8A, foi avaliado o perfil de produção de citocinas e quimiocinas, como  $TNF\alpha$ ,  $INF\gamma$ , CCL2 e CCL5. No entanto, esse tratamento não afetou o nível de produção da CCL2 e de outras moléculas mediadoras da inflamação, como  $TNF\alpha$ ,  $IFN\gamma$  e CCL5.

Além disso, o tratamento diário com 30 $\mu$ g/animal s.c de P8A, antes do aparecimento dos sinais clássicos de deficiência neurológica do modelo de EAE, foi capaz de melhorar o prognóstico da doença verificado por uma escala de severidade clínica. A exibição de uma forma menos grave da doença ocorreu tanto a partir do tratamento diário como também após o tratamento em dose única e a cada dois dias com P8A, o que reforça os resultados anteriores. O mesmo protocolo de tratamento realizado com a molécula íntegra de CCL2 não demonstrou alteração no perfil clínico. A não exacerbação de uma resposta quimiotática sobre o processo de adesão celular pode estar relacionada com mecanismo de dessensibilização, visto que os níveis de CCL2 são aumentados no pico da doença.

Logo, esses dados corroboram a idéia de que a quimiocina CCL2 pode representar uma molécula de grande importância para desenhos de estratégia terapêutica para modelos de inflamação crônica. Embora, os resultados tenham demonstrado com clareza a capacidade inibidora do fármaco P8A, outros estudos

são requeridos para melhor esclarecer os mecanismos pelos quais ocorre essa intervenção na atividade da CCL2.

No mecanismo de migração transendotelial, além das quimiocinas, outras moléculas são atuantes, assim como, as selectinas, participantes do processo de rolamento das células; as moléculas de adesão celular, VCAMs e ICAMs, expressas na superfície das células endoteliais e as integrinas expressas nos leucócitos. A ativação das integrinas será necessária para uma firme adesão celular e, posterior, migração (Wingerchuk *et al.*, 2001). Além desses sistemas, as metaloproteinases de matriz extracelular têm sido apontadas como moléculas importantes durante a migração de linfócitos através da BHE (Kieseier *et al.*, 1999). E, as cininas, que atuam a partir da interação de alta afinidade com receptores acoplados à proteína G, B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, também têm sido apresentadas como moléculas mediadoras durante uma resposta inflamatória e, principalmente, durante o processo de migração celular, como, por exemplo, no modelo de isquemia cerebral (Lehmberg *et al.*, 2003). Outro trabalho mostrou que receptores B<sub>1</sub> são aumentados na superfície de linfócitos T ativados em sangue periférico de pacientes com EM (Prat *et al.*, 1999).

Em modelos de tumor cerebral, foi mostrado que a bradicinina pode aumentar a permeabilidade da BHE, estimulando receptores presentes no endotélio e, iniciando uma resposta, via segundo mensageiro, capaz de promover abertura de tight junctions (Kemper *et al.*, 2004). Embora, a BK tenha sido relacionada com diferentes efeitos fisiopatológicos na periferia, seus efeitos no SNC ainda continuam obscuros (Couture & Lindsey, 2001; Hall & Gepepetti, 1995). Sítios de ligação de alta afinidade têm sido identificados no SNC, principalmente, nos vasos sanguíneos

cerebrais (Couture *et al.*, 2001). Além disso, receptores B<sub>2</sub> têm sido localizados em modelos de tumor cerebral (Liu *et al.*, 2001).

O desenvolvimento de camundongos knockout para os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> tem contribuído para um melhor discernimento sobre o papel do sistema cinina-calicreína em condições fisiológicas e patológicas (Pesquero *et al.*, 2000; Araújo *et al.*, 2001). Portanto, para a investigação do papel dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> de bradicinina e metabólitos durante o recrutamento de leucócitos para o SNC, vasos da pia-máter de camundongos WT, B<sub>1</sub><sup>-/-</sup>, B<sub>2</sub><sup>-/-</sup> com EAE foram analisados *in vivo* quanto aos parâmetros de rolamento e adesão celular.

Foi verificado que a aderência de leucócitos foi diminuída nos camundongos B<sub>1</sub><sup>-/-</sup>, B<sub>2</sub><sup>-/-</sup> com EAE, sem alterar a etapa de rolamento. Entretanto, não foi observada diferença na inibição da aderência de leucócitos entre os dois grupos de camundongo knockout. Estes resultados foram corroborados pela análise histopatológica, demonstrando uma diminuição do influxo de leucócitos e de lesão inflamatória quando comparada com o grupo WT, sem diferença entre os animais knockout. Os cortes de cérebro analisados incluíram as regiões perivasculares da área das meninges e do córtex cerebral. Portanto, o presente estudo sugere claramente um importante papel para ambos os receptores de bradicinina, B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, no controle do processo de adesão de leucócitos na microvasculatura cerebral durante a EAE em camundongos.

Dados interessantes foram observados a partir da análise da medula espinhal, em que tanto os animais B<sub>1</sub><sup>-/-</sup> quanto os animais B<sub>2</sub><sup>-/-</sup> apresentaram foco inflamatório importante na substância branca de magnitude similar ao observado nos animais WT. A lesão ao nível de medula espinhal já é bem caracterizada em pacientes com

EM, evidenciada pela formação de placas desmielinizantes na substância branca. Alguns modelos de EAE também mostram esse quadro de comprometimento da medula espinhal (Brown, 2001; Richards *et al.*, 2002). Esses resultados contraditórios verificados nos animais knockout  $B_1^{-/-}$  e  $B_2^{-/-}$ , podem sugerir uma explicação para a manifestação clínica ainda observada nesses animais. Entretanto, outros estudos são necessários para melhor explicar tais mecanismos.

Resultados anteriores mostraram que as quimiocinas CCL2 e CCL5 estavam envolvidas no processo de adesão leucocitária, sem participar diretamente da etapa de rolamento. E, estudos de outros grupos têm sugerido que a ativação dos receptores de bradicinina também seja requerida para o estímulo de produção de quimiocinas em diferentes modelos de inflamação, incluindo lesão após isquemia e reperfusão (Souza *et al.*, 2003, 2004), dor inflamatória (Poole *et al.*, 1999) e rinite alérgica (Eddleston *et al.*, 2003). Logo, é possível que o sistema cinina regule a expressão de quimiocinas e, conseqüentemente, o recrutamento de leucócitos ativados.

Os resultados obtidos a partir dos animais knockout  $B_1^{-/-}$ ,  $B_2^{-/-}$  mostraram que a expressão de CCL5 associada à EAE foi significativamente suprimida nos animais  $B_2^{-/-}$  quando comparados com o grupo de animais saudáveis. A produção de CCL5 também foi diminuída nos animais  $B_1^{-/-}$ , embora a diminuição tenha sido menos acentuada do que a observada nos animais  $B_2^{-/-}$ . Desta forma, a importância da quimiocina CCL5 na indução do recrutamento de leucócitos na EAE é, mais uma vez, confirmada (dos Santos *et al.*, 2005).

De forma bastante interessante foi observado que, embora o perfil de produção de CCL5, aderência de leucócitos e histopatologia tenha sido semelhante

entre os grupos knockout B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> com EAE, o curso clínico da doença foi menos grave nos animais B<sub>2</sub><sup>-/-</sup> do que nos animais B<sub>1</sub><sup>-/-</sup> e WT.

Estudos têm demonstrado que a molécula CCL2 deve ser crítica não apenas para o recrutamento de leucócitos, mas também para a ativação de células T durante a resposta imune (Mahad & Ransohoff, 2003) e que a deleção do receptor é capaz de inibir a indução de EAE por MOG<sub>35-55</sub> em camundongos (Izikson *et al.*, 2000). Logo, é possível que a inibição da produção de CCL2 observada no animal B<sub>2</sub><sup>-/-</sup> seja responsável pela diminuição na ativação de leucócitos infiltrados e, conseqüentemente, por uma menor severidade da doença. Os animais B<sub>1</sub><sup>-/-</sup> também apresentaram menor inflamação e menos aderência de leucócitos e, no entanto, o nível de CCL2 se manteve elevado, comparado com o animal WT. Desta forma, sugere-se que a presença de CCL2 não foi suficiente para manter o perfil de recrutamento de leucócitos para o SNC, já observado no animal WT.

O grupo B<sub>2</sub><sup>-/-</sup>, além de mostrar menor inflamação no tecido cerebral e menor aderência de leucócitos nos vasos da pia-máter, apresentou níveis diminuídos de CCL2 e CCL5 e, um quadro clínico menos acentuado. Logo, esses dados confirmam a importância da ativação do receptor B<sub>2</sub> da bradicinina no controle da resposta imune e inflamatória no modelo de EAE estudado.

Trabalhos anteriores sugerem que a ativação de receptores B<sub>1</sub> seja dependente de uma ativação prévia de receptores B<sub>2</sub> que, por sua vez, estaria envolvida com o início da resposta inflamatória (Campos & Calixto, 1995). Foi demonstrado que a estimulação de receptores B<sub>2</sub> leva a um aumento transitório da concentração de cálcio e, rapidamente, ocorre uma dessensibilização desses receptores. Em contraste, os receptores B<sub>1</sub> não demonstram susceptibilidade a

mecanismos de dessensibilização e sua estimulação parece ser resultado de uma elevação dos níveis de cálcio (Marceau *et al.*, 2002).

Uma hipótese para o balanço entre a ativação dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> tem sido atribuída ao fato de que os genes para ambos os receptores estão localizados no mesmo cromossomo, sendo o de número 14 em humanos, 6 em ratos e 12 em camundongos (Cayla *et al.*, 2002). Vale ressaltar a importância de estudos mais avançados sobre o contexto cinina-inflamação-EAE. Os resultados obtidos mostram com clareza a participação dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> da bradicinina na ativação endotelial e na transmigração de leucócitos para o SNC, no entanto, os mecanismos pelos quais ambos os receptores controlam a expressão de outras moléculas importantes, como quimiocinas, e o processo de adesão leucocitária ainda não foram totalmente esclarecidos. Além disso, é possível sugerir um balanço entre os dois sistemas receptores e sua importância para o controle de diferentes etapas da patogênese da doença.

Desta forma, os resultados referentes a este trabalho podem concluir que as quimiocinas CCL2 e CCL5 são relevantes na modulação do processo de adesão de leucócitos na microvasculatura cerebral de camundongos com EAE. E, que o desenvolvimento de sistemas farmacológicos que possam inibir essa atividade quimiotática pode representar uma importante estratégia terapêutica. Além disso, foi possível sugerir que a ativação dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> da bradicinina pode representar um forte sistema de controle do processo de recrutamento de leucócitos, através da regulação quimiocinas.

Por décadas os sistemas fisiológicos foram estudados e explorados como estruturas isoladas capazes de reagir apenas através de sua arquitetura celular.

Foram necessários anos de estudo e dedicação laboratorial para compreender que os sistemas são integrados como um grande eixo ancorado por diferentes moléculas pleiotrópicas. Contudo, a evidência de que o sistema bradicinina, além de sua potente ação vasoativa, possui uma participação no desenvolvimento da resposta inflamatória no modelo murino da EM, encanta e desafia a sociedade científica para novos estudos e, conseqüente desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para doenças inflamatórias crônicas como a EM.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

✓ O recrutamento de leucócitos para o SNC foi evidenciado como etapa marcante na patogenia da EAE, com um aumento de células em rolamento e aderidas na região perivascular da pia-máter. E este aumento no influxo de leucócitos para o SNC foi acompanhado pelo período de manifestação clínica e pela análise histopatológica em cortes do cérebro.

✓ As quimiocinas CCL2 e CCL5 mostraram-se moléculas importantes no modelo estudado, com um aumento dos seus níveis no tecido nervoso durante o pico de manifestação clínica e de recrutamento de leucócitos para o SNC.

✓ A neutralização dessas quimiocinas com o uso de anticorpos específicos, anti-CCL2 e anti-CCL5, evidenciou sua participação no processo de adesão leucocitária, sem interferir no evento de rolamento, uma observação realizada através da microscopia intravital.

✓ O tratamento com a proteína mutante da CCL2 (P8A) levou a diminuição do processo de adesão, além de permitir um quadro menos severo da doença. Confirmando o importante papel da quimiocina CCL2 durante a patogenia da EAE, tanto no processo de adesão de leucócitos quanto no desenvolvimento clínico da doença.

✓ O tratamento com P8A sugere que o bloqueio da atividade da quimiocina CCL2 pode representar uma importante estratégia terapêutica, prevenindo o influxo de células ativadas para o SNC e diminuindo a gravidade da doença.

✓ Quanto aos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> da BK, foi verificada uma possível participação do sistema cinina durante a regulação do processo adesão de leucócitos na microvasculatura da pia-máter em animais com EAE. E o controle do processo de migração de leucócitos pode ser através da regulação de outros mediadores inflamatórios, como as quimiocinas CCL2 e CCL5. Visto que, a deleção do gene para o receptor B<sub>2</sub> promoveu uma redução de CCL2 e CCL5.

✓ Foi possível verificar um balanço entre a ativação dos diferentes receptores, B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>. Quando a ativação do receptor B<sub>2</sub> foi requerida para a expressão de B<sub>1</sub>, indicando um papel protetor para o receptor B<sub>2</sub>.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, C.W., Poston, R.N., Buk, S.J., 1989. Pathology, biochemistry and immunocytochemistry of lesions in acute multiple sclerosis. *J. Nat. Sci.* 92, 291.

Ahluwalia, A., Perretti, M., 1999. B1 receptors as a new target. Could this B the 1? *TIPS.* 20, 100-103.

Al-Omaishi, J., Bashir, R. & Gendelman, H. E. 1999. The cellular immunology of multiple sclerosis. *J. Leukoc. Biol.* 65: 444-452.

Ali, S., Palmer, A.C.V., Banerjee, B., Fritchley, S.J. Kirby, J.A. 2000. Examination of the function of RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  following interaction with heparin-like glycosaminoglycans. *J. Biol. Chem.* 275(16):11721-11727.

Antel, P. J. & Owens, T. 1999. Immune regulation and CNS autoimmune disease. *J Neuroimmunol.* 100: 181-189.

Araújo, R.C., Kettritz, R., Fichtner, I., Paiva, A.C.M., Pesquero, J.B., Bader, M. 2001. Altered neutrophil homeostasis in kinin B1 receptor knockout mice. *Biol. Chem.* 382:92-95.

Ascherio, A., Munger, K.L., Lennette, E.T., Spiegelman, D., Hernan, M.A., Olek, M. j., Hankinson, S.E., Hunter, D.J. 2001. Epstein-Barr virus antibodies and risk of multiple sclerosis: a prospective study. *JAMA*.286:3083-3088.

Babcock, A. Owens, T., 2003. Chemokines in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 520, 120.

Baggiolini, M. 1998. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature*. 342:565-568.

Balashov, K.E., Rottman, J.B., Weiner, H.L., Hancock, W.W., 1999. CCR5(+) and CXCR3(+) T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1 alpha and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 6873-6878.

Banisor, I., Leist, T.P., Kalman, B. 2005. Involvement of  $\beta$ -chemokines in the development of inflammatory demyelination. *J. Neuroinflammation*. 2:1-14.

Baranzini, S.E., Elfstrom, C., Chang, S.Y., Butunoi, C., Murray, R., Higuchi, R., Okseberg, J.R. 2000. Transcription analysis of multiple sclerosis brain lesions reveals a complex pattern of cytokine expression. *J. Immunol.* 165(11): 6576-6582.

Bernard, C. C. A., John, T. G., Slavin, A., Ichikawa, M., Ewing, C., Liu, J. & Bettadapura, J. 1997. Myelin oligodendrocyte glycoprotein: a novel candidate autoantigen in multiple sclerosis. *J Mol Med* 75: 77-88.

Biber, K., Zuurman, M.W., Dijkstra, I.M., Boddke, H. 2002. Chemokines in the brain: neuroimmunology and beyond. *Curr Opin Pharmacol*. 2:63-68.

Bradl, M., Hohlfeld, R., 2003. Molecular pathogenesis of neuroinflammation. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 74, 1364-1370.

Boven, L.A., Montagne L., Nottet, H.S., De Groot, C.J. 2000. Macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1alpha), MIP1-beta, and RANTES mRNA semiquantification and protein expression in active demyelinating multiple sclerosis (MS) lesions. *Clin. Exp. Immunol*. 122(2):257-263.

Brown, K.A. 2001. Factors modifying the migration of lymphocytes across the blood-brain barrier. *Int. Immunopharmacol*. 1(12): 2043-2062.

Calixto, J.B., Cabrini, D.A., Ferreira, J., campos, M.M. 2000. Kinins in pain and inflammation. *Pain*. 87:1-5.

Calixto, J.B., Cabrini, D.A., Ferreira, J., Campos, M.M. 2001. Inflammatory pain: kinins and antagonists. *Curr. Opin. Anaesthesiol*. 14:519-526.

Campos, M.M., Calixto, J.B. 1995. Involvement of B1 and B2 receptors in bradykinin-induced rat paw oedema. *Br. J. Pharmacol.* 1005.

Cartier, L., Hartley O., Dubois-Dauphain, M., Krause, K. 2005. Chemokine receptors in the central nervous system: role in brain inflammation and neurodegenerative diseases. *Brain Res. Rev.* 48:16-42.

Carvalho-Tavaves, J., Hickey, M.J., Hutchison, J. Michaud, J., Sutcliffe, I.T., Kubes, P., 2000. A role for platelets and endothelial selectins in tumor necrosis factor(-induced leukocyte recruitment in the brain microvasculature. *Circ. Res.* 87, 1141-1148.

Cayla, C., Merino, F., Cabrini, D.A., Silva, J.A., Pesquero, J.B., Bader, M. 2002. Structure of the mammalian kinin receptor gene locus. *Int. Immunopharmacol.* 13-14:1721-1727.

Chensue, S. W., Warmington, K. S., Allenspach, E.J., Lu, B., Gerard, G., Kunkel, S.L., Lukacs N. W., 1999. Differential expression and cross-regulatory function of RANTES during mycobacterial (type 1) and schistosomal (type 2) antigen-elicited granulomatous inflammation. *J. Immunol.* 163, 165-173.

Coelho, P.S., Klein, A., Talvani, A., Coutinho, S.F., Takeuchi, O., Akira, S., Silva, J.S., Canizzaro, H., Gazzinelli, R.T., Teixeira, M.M., 2002. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes

induce in vivo leukocyte recruitment dependent on MCP-1 production by IFN- $\gamma$ -primed-macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 71, 834-844.

Compston, A. Coles. A. 2002. Multiple Sclerosis. *Lancet.* 359 :1221-1231.

Costa, O., Divoux, D., Ischenko, A., Tron, F., Fontaine, M. 2003. Optimization of an animal model of encephalomyelitis autoimmune experimental achieved with a multiple MOG 35-55 peptide in C57BL/6/J strain of mice. *J Autoimmun.* 20(1):51-61.

Couture, R., Harrison, M., Vianna, R.M., Cloutier, F., 2001. Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur. J. Pharmacol.* 429, 161-176.

Couture, R., Lindsey, C.J. 2001. Brain kallikrein-kinin system: from receptors to neuronal pathways and physiological functions. In: Quirion, R., Björklund A., Hökfeld, T. (Eds) *Handbook of chemical anatomy.* 16, 241-298.

D'Ambrosio, D., Panina-Bordignon, P., Sinigaglia, F. 2003. Chemokine receptors in inflammation: an overview. *J. Neuroimmunol. Methods.* 273:3013.

dos Santos, A.C, Barsante, M.M., Arantes, R.M.E., Bernard, C.C.A., Teixeira, M.M., Carvalho-Tavares, J., 2005. CCL2 and CCL5 mediate leukocyte adhesion in experimental autoimmune encephalomyelitis – an intravital microscopy study. *J. Neuroimmunol.* 162, 122-129.

Dray, A., Perkins, M.N. 1997. Kinins and pain. In: Farmer, S.G. (Ed). The kinin system. Acad. Press Inc, San Diego, CA, 157-172.

Eddeleston, J., Christiansen, S.C., Jenkins, G.R., Koziol, J.A., Zuraw, B.L. 2003. Bradykinin increases the in vivo expression of CXC chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 in patients with allergic rhinitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111, 106-112.

Egg, R., Reindl, M., Deisenhammer, F., Linington, C. & Berger, T. 2001. Anti-MOG and anti-MBP antibody subclasses in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis* 7: 285-289.

Elhofy, A., Wang, J., Tani, M., Fife, B.T., Kennedy, K.J., Bennett, J., Huang, D., Ransohoff, R.M., Karpus, W.J. 2005. Transgenic expression of CCL2 in the central nervous system prevents experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Leukoc. Biol.* 77:229-237.

Ferreira, J., Campos, M.M., Araújo, R., Bader, M, Pesquero, J.B., Calixto, J.B., 2002. The use of kinin B1 and B2 receptor knockout mice and selective antagonists to characterize the nociceptive responses caused by kinins at spinal level. *Neuropharmacol.* 43, 1188-1197.

Genain, C.P., Canella, B., Hauser, S.L., Raine, C.S. 1999. Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. *Nature Med.* 5(2): 170-175.

Giuliani, F., Yong, V.W. 2003. Immune-mediated neurodegeneration and neuroprotection in MS. *Int. MS. J.* 10(4): 122-30.

Glabinski, A.R. Tani, M., Tuthill, R.J., Tuohy, U.K., Ransohoff, R.M. 1995. Central nervous system chemokine mRNA accumulation follows murine initial leukocyte entry at the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Behav. Immun.* 9(4): 315-330.

Glass, W.G., Hickey, M.J., Hardison, J.L., Liu, M.T., Manning, J.E., Lane, T.E., 2004. Antibody targeting of the CC chemokine ligand 5 results in diminished leukocyte infiltration into the central nervous system and reduced neurologic disease in a viral model of multiple sclerosis. *J. Immunol.* 172(7): 4018-25.

Haase, C. G. & Linington, C. 2001. The fine specificity of myelin oligodendrocyte glycoprotein autoantibody response in patients with multiple sclerosis and normal healthy controls. *J Neuroimmunol* 114: 220-225.

Hafler, D.A. 2004. Multiple Sclerosis. *J Clin. Invest.* 113(6): 788-794.

Hall, J.M., Geppetti, P. 1995. Kinins and kinin receptor in the nervous system. *Neurochem. Int.* 26, 17-26.

Hoogewert, A.J., Kuschert, G.S.V., Proudfoot, A.E., Borlat, F., Clark-lewis, I., power, C.A., Wells, T.N.C. 1997. Glycosaminoglycans mediate cell surface oligomerization of chemokines. *Biochemistry*. 36:13570-13578.

Izikson, L., Klein, R.S., Charo, I.F., Weiner, H.L., Luster, A.D., 2000. resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis in mice lacking the CC chemokine receptor (CCR)2. *J. Exp. Med.* 192, 1075-1080.

James, W.G., Bullard, D.C., Hickey, M.J., 2003. Critical role of the (4 integrin/VCAM-1 pathway in cerebral leukocyte trafficking in lupus-prone MRL/faz IPR mice. *J. Immunol.* 170, 520-527.

Jee, Y., Yoon, W.K., Okura, Y. Tanuma, N., Matsumoto, Y. 2002. Upregulation of monocyte chemotatic protein-1 and CC chemokine receptor 2 in the central nervous system is closely associated with relapse of autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats. *J. Neuroimmunol.* 128:49-57.

Johns, T.G., Rosbo, K.N., Menon, K.K., Abo,S., Gonzales, M.F., Bernard, C.C.A. 1995. Myelin oligodendrocyte glycoprotein induces a demyelinating encephalomyelitis resembling multiple sclerosis. *J. Immunol.* 154:5536-5541.

Johns, T.G., Bernard, C.C.A. 1999. The structural and function of myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J Neurochem.* 72:1-9.

Johnson, Z., Kosco-Vilbois, M.H., Herren, S., Cirillo, R., Muzio, V., Zarantin, P., Carbonatto, M., Mack, M., Smailbegovic, A., Rose, M., Lever, R., Page, C., Wells, T.N., Proudfoot, A.E. 2004. Interference with heparin binding and oligomerization creates a novel anti-inflammatory strategy targeting the chemokine system. *J. Immunol.* 173(9):5776-5785.

Johnson, Z., Proudfoot, A.E., Handel, T.M. 2005. Interaction of chemokines and glycosaminoglycans: a new twist in the regulation of chemokine function with opportunities for therapeutic intervention. *Cytokines & Growth Factor Reviews.* 16: 625—636.

Juedes, A.E., Hjelmstrom, P., Bergman, C.M., Neild, A.L., Ruddle, N. H. 2000. Kinetics and cellular origin of cytokines in the central nervous system: insight into mechanisms of myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Immunol.* 164:419-426.

Karpus, W.J., LuKacs, N.W., McRae, B.L., Strieter, R.M., Kumkel, S.L., miller, S.D., 1995. An important role for the chemokine macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  in the pathogenesis of the T cell-mediated autoimmune disease, experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 155, 5003-5010.

Kemper, E.M., Boogerd, W., Thuis, I., Beijinen, J.H., Tellingen, O. 2004. Modulation of the blood-brain barrier in oncology: therapeutic opportunities for the treatment of brain tumors. *Cancer Treatment Reviews*. 30:415-423.

Kennedy K.J., Strieter, R.M., Luckacs, N.W., Karpus, W.J. 1998. Acute and relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis are regulated by differential expression of the CC chemokines macrophage inflammatory protein-1 alpha and monocyte chemoattractant protein-1. *J. Neuroimmunol.* 92, 98-108.

Kerfoot, S.M. and Kubes, P., 2002. Overlapping roles of P-selectin and alpha 4-integrin to recruit leukocytes to the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 169(2): 1000-6.

Kieseier, B. C., Archelos, J. J., Storch, M., Gold, R. & Hartung, H. 1999. The immunopathogenesis of Multiple Sclerosis. *Wiener Klinische Wochenschrift* 111: 728-737.

Klein, R. S., Izikson, L., Means, T., Gibson, H. D., Lin, E., Sobel, R. A., Weiner, H. L. Luster, A. D., 2004. IFN-inducible protein-10/CXC chemokine ligand 10-independent induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 172,550-559.

Kornek, B., Lassmann, H. 2003. Neuropathology of multiple sclerosis – new concepts. *Brain Res Bulletin.* 61: 321-326.

Kramer, E. M., Schardt, A. & Nave, K. 2001. Membrane traffic in myelinating oligodendrocytes. *Microscopy Research and Techniques* 52: 656-671.

Kroepfl, J. F., Viise, L. R., Charron, A. J., Linington, C. & Gardinier, M. V. 1996. Investigation of myelin/oligodendrocyte glycoprotein membrane topology. *J Neurochem.* 67: 2219-2222.

Kubes, P. 2002. Introduction: the complexities of leukocyte recruitment. *Semin Immunol.* 14: 65-72.

Kurose, I., Argembright, L.W., Anderson, D.C., Tolley, J., Miyasaka, M., Harris, N., Granger, D.N. 1997. Reperfusion-induced leukocyte adhesion and vascular protein leakage in normal and hypercholesterolemic rats. *Am. J. Physiol.* 273: H854-H860.

Kuschert, G.S.V., Coulin, F., Power, C.A., Proudfoot, A.E., Hubbard, R.E., Hoogewerf, A.J., Wells, T.N.C. 1999. Glycosaminoglycans interact selectively with chemokines and modulate receptor binding and cellular responses. *Biochemistry.* 38:12959-12969.

Lau, E.K., Paavola, C.D., Johnson, Z., Gaudry, J., Geretti, E., Borlat, F., kungl, A.J., Proudfoot, A.E., Handel, T.M. 2004. Identification of glycosaminoglycan binding site of the CC chemokine, MCP-1. *J Biol. Chem.* 279 (21): 22294-22305.

Laurence, J.S., Blanpain, C., Burgner, J.W., Parmentier, M., LiWang, P.J. 2000. CC chemokine MIP-1 beta can function as a monomer and depends on Phe13 for receptor binding. *Biochemistry*. 39(12):3401-3409.

Lehmberg, J., Beck, J., Baethmann A., Uhl, E., 2003. Bradykinin antagonists reduce leukocyte-endothelium interactions after global cerebral ischemia. *J. Cerebral Blood Flow & Metab.* 23, 441-448.

Linington, C., Bradl, M., Lassmann, H., Brunner, C., Vass, K. 1988. Augmentation of demyelination in rat acute allergic encephalomyelitis by circulating mouse monoclonal antibodies directed against a myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *Am. J. Pathol.* 130(3):443-54.

Linington, C., Engehardt, B., Kapocs, G., Lassmann, H. 1992. Induction of persistently demyelinated lesions in the rat following the repeated adoptive transfer of encephalitogenic T cells and demyelinating antibody. *J. Neuroimmunol* 40(2-3):219-224.

Liu Y., Hashizume, K., Chen, K., Samoto, K., Ningaraj, N., Asotra, K., Black, K.L. 2001. Correlation between bradykinin-induced blood-tumor barrier permeability and B2 receptor expression experimental brain tumors. *Neurol. Res.* 23(4),379-387.

Lukacs N. W., Strieter, R.M., Warmington, K., Lincoln, P., Chensue, S. W., Kunkel, S.L., 1997. Differential recruitment of leukocyte populations and alteration of airway

hyperreactivity by C-C family chemokine in allergi airway inflammation. *J. Immunol.* 158(9):4398-4404.

Mackay,C.R. 2001. Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat. Immunol.* 2(2): 95-101.

Mahad, D,J. and Ransohoff, R.M., 2003. The role of MCP-1 (CCL2) and CCR2 in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Semin. Immunol.* 15, 23-32.

Mahad, D., Callahan, M.K., Williams, K.A., Ubogu, E.E., Kivisakk, P., Tucky, B., Kidd, G., Kingsbury, G.A., Chang, A., Fox, R.J., Mack, M., Sniderman, M.B., Ravid, R., Staugaitis, S.M., Stins, M.F., Ransohoff, R.M. 2005. Modulation CCR2 and CCL2 at the blood-brain barrier: relevance for multiple sclerosis pathogenesis. *Brain.* 1-12.

Marceau, F., Hess, J.F., Bachvarov, D.R. 1998. The B1 receptors for kinins. *Pharmacol. Rev.* 50, 357-386.

Marceau, F., Sabourin, T., Houle, S., Fortin, J.P., Petitclerc, E., Molinaro, G., Adam. A. 2002. Kinin receptors: functionl aspects. *Int. Immunopharmacol.* 13-14:1729-1739.

Marceau, F., Regoli, D., 2004. Bradykinin receptor ligants: therapeutic perspectives. *Nat. Rev.* 3, 845-852.

Martin, R., Ruddle, N. H., Reingold, S. & Hafler, D. A. 1998. T helper cell differentiation in multiple sclerosis and autoimmunity. *Immunol Today* 19: 495-498.

Martin, L., Blanpain, C., Garnier, P., Wittamer, V., Parmentier, M., Vita, C. 2001. Structural and functional analysis of the RANTES-glycosaminoglycans interactions. *Biochemistry*. 40:6303-6318.

Martino, G., Furlan, R., Brambilla, E., Bergami, A., Ruffini, F., Gironi, M., Poliani, P. L., Grimaldi, L. M. E. & Comi, G. 2000. Cytokines and immunity in multiple sclerosis: the dual signal hypothesis. *Journal of Neuroimmunology* 109: 3-9.

Matute, C., Pérez-Cerdá, F. 2005. múltiple Sclerosis: a novel perspectives on newly forming lesions. *Trends in Neurosciences*. 28 (4): 173-175.

McCafferty, D.M., Kanwar, S., Granger, N., Kubes, P., 2000. E/P-selectin-deficient mice: an optimal mutation for abrogating antigen but not tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced immune responses. *Eur. J. Immunol.* 30, 2362-2371.

McLean, P.G., Ahluwalia, A, Perreti, M. 2000. Association between kinin B(1) receptor expression and leukocyte trafficking across mouse mesenteric postcapillary venules. *J. Exp. Med.* 192, 367-380.

Murphy, P.M., Baggiolini, M., Charo, I.F., Hebert, C.A., Horuk, R., Matsushima, K., Miller, L.H., Oppenheim, J.J., Power, C.A. 2000. International union of pharmacology. XXX. Update on chemokine receptor nomenclature. *Pharmacol. Rev.* 54 (1): 147-176.

Murphy, P.M. 2002. International union of pharmacology. XXX. Update on chemokine receptor nomenclature. *Pharmacol. Rev.* 54(2): 227-229.

Noda, M., Kariura, Y., Amano, T., Manago, Y., Nishikawa, K., Aoki, S., wada, K., 2003. Expression and function of bradykin receptors in microglia. *Life Sci.* 72, 1573-1581.

Noda, M., Kariura, Y., Amano, T., Manago, Y., Nishikawa, K., Aoki, S., wada, K., 2004. Kinin receptors in cultured rat microglia. *Neurochem. International.* 45,437-442.

Noseworthy, J. H. 1999. Progress in determining the causes and treatment of MS. *Nature* 399(Suppl): A40.

Paavola, C.D., Hemmerich, S., Grunberger, D., Polsky, I., Bloom, A., Freedman, R., Mulkins, M., Bhakta, S., McCarley, D., Wiesent, L., Wong, B., Jarnagin, K., Handel., T.M. 1998. Monomeric monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) binds and activates the MCP-1 receptor CCR2B. *J. Biol. Chem.* 273 (50): 33157-33165.

Peacock, J.W., ElSawa, S.F., Petty, C.C., Hickey, W.F., Bost, K.L. 2003. Exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis in rodents infected with murine gammaherpes virus-68. *Eur. J. Immunol.* 33: 1849-1858.

Pease, J.E., Williams, T.J. 2006. The attraction of chemokines as a target for specific anti-inflammatory therapy. *Br. J. Pharmacol.* 147: 212-221.

Pesquero, J.B., Araujo, R.C., Heppenstall, P.A., Stucky, C.I., Silva, J.A., Walther, Jr.T., Oliveira, S.M., Pesquero, J.L., Paiva, A.C., Calixto, J.B., 2000. Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 8140.

Piccio, L., Rossi, B., Scarpini, E., Laudanna, C., Giagulli, C., Issekutz, A.C., Vestweber, D., Butcher, E.C., Constantin, G., 2002. Molecular mechanisms involved in lymphocyte recruitment in inflamed brain microvessels: critical roles for P-selectin glycoprotein ligand-1 and heterotrimeric G<sub>i</sub>-linked receptors. *J. Immunol.* 168, 1940-1949.

Poole, S., Lorenzetti, B.B., Cunha, J.M., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H. 1999. Bradykinin B1 and B2 receptors, tumor necrosis factor alpha, and inflammatory hyperalgesia. *Br. J. Pharmacol.* 126(3):649-656.

Poser, C. M., Paty, D. N., Scheinberg, L., McDonald, I., Davis, F. A., Elbers, G. C., Johnson, K. P., Sibley, W. A., Silbeberg, D. H. & Tourtellotte, W. W. 1983. *New*

diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann. Neurol.* 13(3): 227-231.

Prat, A., Weinrib, L., Becher, B., Poirier, J., Duquette, P., Couture, R., Antel, J.P., 1999. Bradykinin B1 receptor expression and function on T lymphocytes in active multiple sclerosis. *Neurology.* 53(9): 2087-2092.

Prat, A., Biernacki, K., Saroli, T., Orav, J.E., Guttmann, C.R., Weiner, H.L., Khoury, S.J., Antel, J.P. 2005. Kinin B1 receptor expression on multiple sclerosis mononuclear cells correlation with magnetic resonance imaging T2 – weighted lesion volume and clinical disability. *Arch. Neurol.* 62(5):795-800.

Prineas J.W., Wright, R.G. 1978. Macrophages, lymphocytes, and plasma cells in the perivascular compartment in chronic multiple sclerosis. *Lab. Invest.* 38(4):409-421.

Proudfoot, A.E., Buser, R., Borlat, F., Alouani, S., Soler, D., Offord, R.E., Schroder, J.M., Power, C.A., Wells, T.N. 1999. Amino-terminally modified RANTES analogues demonstrate differential effects on RANTES receptors. *J. Biol. Chem.* 274(45): 32478-85.

Proudfoot, A.E., Power, C.A., Wells, T.N. 2000. The strategy of blocking the chemokine system to combat disease. *Immunol. Rev.* 177: 246-256.

Proudfoot, A.E., Fritchley, S., Borlat, F., Shaw, J.P., Vilbois, F., Zwahlen, C., Trkola, A., Marchant, D., Clapham, P.R., Wells, T.N.C. 2001. The BBXB motif of RANTES is the principal site for heparin binding and controls receptor selectivity. *J Biol Chem* 276(14):10620-10626.

Proudfoot, A.E. 2002. Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. *Nat. Rev. Immunol.* 2(2): 106-115.

Proudfoot, A.E., Handel, T.M., Johnson, Z., Lau, E.K., LiWang, P., Clark-Lewis, I., Borlat, F., Wells, T.N., Kosco-Vilbois, M.H. 2003. Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100(4): 1885-1890.

Raine, C. S. & Cross, A. H. 1989. Axonal dystrophy as a consequence of long-term demyelination. *Lab Invest.* 60: 714-725.

Rajaraman, K., Sykes, B.D., Kay, C.M., Dewald, B., Geiser, T., Baggiolini, M., Clark-Lewis, I. 1994. Neutrophil activation by monomeric interleukin-8. *Science.* 264(5155):90-92.

Ransohoff, R.M., Kivisakk, P., Kidd, G. 2003. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev.* 3: 569-581.

Richards, R. G., Sampson, F. C., Beard, S. M. & Tappenden, P. 2002. A review of the natural history and epidemiology of multiple sclerosis: implications for resource allocation and health economic models. *Health Tech Assess.* 6: 1-73.

Rosbo, N. K. & Ben-Num, A. 1998. T-cell responses to myelin antigens in MS; relevance of the predominant autoimmune reactivity to myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J Autoimmunity* 11: 287-299.

Rot, A., von Andrian, U.H. 2004. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells. *Annu. Rev. Immunol.* 22:891-929.

Rottman, J.B., Slavin, A.J., Silva, R., Weiner, H.L., Gerard, C.G., Hancock, W.W. 2000. Leukocyte recruitment during onset of experimental allergic encephalomyelitis is CCR1 dependent. *Eur. J. Immunol.* 30(8): 2372-2377.

Sasisekharan, R. e Venkataraman, G. 2000. Heparin and heparan sulfate: biosynthesis, structure and function. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4 (6):626-631.

Selmaj, K. W. & Raine, C. S. 1998. Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocyte damage *in vitro*. *Annals of Neurol.* 23: 339-346.

Schmidt, S. 1999. Candidate autoantigens in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis* 5: 147-160.

Schraufstatter, I.U., Chung, I., Burger, M. 2001. IL-8 activated endothelial CXCR1 and CXCR2 through Rho and Rac signaling pathways. *Am. J. Physiol.* 280:1094-1103.

Schwaninger, M., Sallmann, S., Petersen, N., Schneider, A., Prinz, S., Libermann, T.A., Spranger, M. 1999. Bradykinin induces interleukin-6 expression in astrocytes through activation of nuclear factor-kappaB. *J. Neurochem.* 73: 1461-1466.

Scolding, N. J. & Franklin, R. J. M. 1998. Axon loss in multiple sclerosis. *Lancet* 352: 340-341.

Song, L., Pachter, J.S. 2004. Monocyte chemoattractant protein-1 alters expression of tight junction-associated proteins in brain microvascular endothelial cells. *Microvascular Res.* 67:78-89.

Sorensen, T, L., Tani, M., Jensen, J., Pierce, V., Luchinetti, C., Folcik, V.A., Qin, S., Rottman, J., Sellebjerg, F., Strieter, R.M., 1999. Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. *J. Clin. Invest.* 103, 807-815.

Sorensen, T.L., Ransohoff, R.M., Strieter, R.M., Sellebjerg, F. 2004. Chemokine CCL2 and chemokine receptor CCR2 in early active multiple sclerosis. *Eur. J. Neurol.* 11:445-449.

Souza, D.G., Pinho, V., Pesquero, J.L., Lomez, E.S., Poole, S., Juliano, L., Correa Jr, A., de A Castro, M.S., Teixeira, M.M., 2003. Role of bradykinin B2 receptor for the local and systemic inflammatory responses that follow severe reperfusion injury. *Br. J. Pharmacol.* 139:129.

Souza, D.G., Lomez, E.S.L., Pinho, V., Pesquero, J.B., Bader, M., Pesquero, J.L., Teixeira, M.M., 2004. Role of bradykinin B2 and B1 receptors in the local, remote, and systemic inflammatory responses that follow intestinal ischemia and reperfusion injury. *J. Immunol.* 172, 2542-2548.

Sugahara, K., Mikami, T., Uyama, T., Mizuguchi, S., Nomura, K., Kitagawa, H. 2003. recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 13(5): 612-620.

Tanaka, Y., Adams, D.H., Hubscher, S., Hirano, H., Siebenlist, U., Shaw, S. 1993. T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 beta. *Nature.* 361(6407): 79-82.

Tang, T., Frenette, P.S., Hynes, R.O., Wagner, D.D., Mayadas, T.N., 1996. Cytokine-induced meningitis is dramatically attenuated in mice deficient in endothelial selectins. *J. Clin. Invest.* 97(11), 2485-2490.

Taylor, K.R., Gallo, R.L. 2006. Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated and molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. *Faseb J.* 20:9-22.

Tran, E.H., Kuziel, W.A., Owens, T. 2000. Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice deficient on either the chemokine macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  or its CCR5 receptor. *Eur. J. Immunol.* 30:1410-1415.

Trebst, C., Ransohoff, R.M., 2001. Investigating chemokines and chemokine receptors in patients with multiple sclerosis: opportunities and challenges. *Arch. Neurol.* 58, 1975-1980.

Waxman, S.G. Ritchie, J.M. 1985. Organization of ion channels in the myelin nerve fiber. *Science.* 228:1502-1507.

Warren, K. G., Catz, I. & Steinman, L. 1995. Fine specificity of the antibody response to myelin basic protein in the central nervous system in multiple sclerosis: The minimal B-cell epitope and a model of its features. *Proceedings of the National Academy of Science* **92**: 11061-11065.

Weber, F. 2001. Effects of auto-reactive T cells and cytokines in the pathogenesis of Multiple Sclerosis. *MSJ.* 9(1):29-35.

Wingerchuk, D. M., Lucchinetti, C. F. & Noseworthy, J. H. 2001. Multiple Sclerosis: Curr Pathophysiol Concepts. Lab Invest. 81: 263.

Van Noort, J. M., Amor, S., Baker, D., Layward, L. & McCormack, K. 1997. Multiple Sclerosis: variations on a theme. Immunol Today 18: 368-371.

Vora, A.J., Kidd, D., Miller, D.H., Perkin, G.D., Hughes, R.A.C., Ellis, B.A., Dumonde, D.C., Brown, K.A., 1997. Lymphocyte-endothelial cell interactions in multiple sclerosis: disease specificity and relationship to circulation tumor necrosis factor- $\alpha$  and soluble adhesion molecules. Mult. Scler. 3, 171-179.

Zhang, Y., Rollins, B.J. 1995. A dominant negative inhibitor indicates that monocyte chemoattractant protein 1 functions as a dimer. Mol. Cell. Biol. 15:4851-4865.

**ANEXOS**

