



Universidade Federal de Juiz de Fora
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**NÚCLEO DE PESQUISAS EM
IMUNOLOGIA**

MARCIO LUIZ DE PAULA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO IMUNOMODULADOR
DA ISOFLAVONA GENISTEÍNA NA
ENCEFALOMIELITE AUTOIMUNE
EXPERIMENTAL MURINA**

Juiz de Fora
2007

MARCIO LUIZ DE PAULA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO IMUNOMODULADOR
DA ISOFLAVONA GENISTEÍNA NA
ENCEFALOMIELITE AUTOIMUNE
EXPERIMENTAL MURINA**

Trabalho de Dissertação de Mestrado do
Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde, Núcleo de Pesquisas em Imunologia, da
Faculdade de Medicina da Universidade Federal
de Juiz de Fora

Orientadora: Prof. Dr. Ana Paula Ferreira

Juiz de Fora
2007

De Paula, Marcio Luiz

Avaliação do efeito imunomodulador da isoflavona genisteína na encefalomielite autoimune experimental murina / Marcio Luiz De Paula; orientadora: Prof. Dr. Ana Paula Ferreira – 2007.

53 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde - Núcleo de Pesquisas em Imunologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora – 2007.

1. Esclerose múltipla. 2. Encefalomielite autoimune experimental. 3. Genisteína. 4. Citocinas. I. Ferreira, Ana Paula, orientadora. II. Título.

CDU 616.8-004

Agradecimentos

À minha família pelo estímulo e apoio incondicional nesta realização.

Aos meus amigos pelo incentivo constante.

Aos Professores Ana Paula Ferreira e Henrique Couto Teixeira por me receberem no Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Juiz de Fora e por acreditarem na concretização deste projeto.

À Professora Michele Gomes Barsante pelo intercâmbio de informações com a Universidade Federal de Minas Gerais e pelos experimentos por ela conduzidos.

À Professora Maria Aparecida de Souza pelo seu otimismo inigualável e pelo seu incondicional apoio em todas as fases da dissertação.

Aos meus amigos do Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Juiz de Fora pelo apoio constante e pelo inestimável auxílio na execução dos experimentos.

À CAPES, FAPEMIG e CNPq pelo suporte financeiro fornecido ao projeto.

Àqueles cujos nomes involuntariamente omitimos.

Resumo

A Esclerose Múltipla é uma doença autoimune que acomete o Sistema Nervoso Central. O modelo animal mais amplamente utilizado para o estudo desta patologia é o da encefalomielite autoimune experimental (EAE), comumente induzida em camundongos. Em estudos anteriores, observou-se que o estrógeno representa um papel central na resposta imune e nas doenças imunomediadas. Os fitoestrógenos representam uma família de compostos vegetais com propriedades estrogênicas, pois apresentam muitas similaridades estruturais com os estrógenos endógenos, inclusive ligando-se aos seus receptores. O presente trabalho teve como objetivo testar o fitoestrógeno genisteína em camundongos da linhagem C57Bl/6 com EAE. Para isto, foi inicialmente padronizado o modelo de EAE e, posteriormente, o efeito imunomodulador da isoflavona genisteína foi analisado não somente através da avaliação clínica dos camundongos como também pela produção de citocinas Th1 e Th2, além da interação dos leucócitos com o endotélio cerebral.

Palavras-chave: esclerose múltipla; encefalomielite autoimune experimental; genisteína; citocinas.

Abstract

Multiple sclerosis (MS) is the most common non-traumatic, disabling neurological human inflammatory demyelinating disease of the CNS. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) models MS and is characterized as a CD4⁺ Th1 cell-mediated autoimmune disease. Recent data show that estrogen plays a pivotal role in the immune response as well as in immune-mediated diseases. Isoflavones are found in a variety of plants, especially in soy, and make up the most common form of phytoestrogens which demonstrate estrogenic properties due to their structural similarities with estrogens.

Genistein is the major bioactive isoflavone. In the present report, we investigated the use of genistein for the treatment of the murine model of MS in C57Bl/6 mice. The genistein's modulatory effects were evaluated after induction of EAE with MOG₃₅₋₅₅, assessing not only clinical symptoms but also pro- and anti-inflammatory cytokines, and the leukocyte rolling and adherence in the CNS by performing intravital microscopy.

Keywords: multiple sclerosis; experimental autoimmune encephalomyelitis; genistein; cytokines.

Lista de abreviaturas e símbolos

°C	-grau centígrado
CD	-grupo de diferenciação (<i>cluster of differentiation</i>)
C57Bl/6	-linhagem de camundongos isogênicos
dpi	-dias pós-imunização
EAE	-encefalomielite autoimune experimental
EM	-esclerose múltipla
g	-gravidade
IFN- γ	-interferon-gama
IL	-interleucina
ip	-via intraperitoneal
JHM	-vírus da hepatite murina
kg	-quilograma
l	-litro
LCR	-líquido céfalo-raquidiano
m	-molar
mg	-miligrama
min	-minuto
ml	-mililitro
mM	-milimolar
MOG	-proteína mielodendrítica (<i>myelin oligodendrocyte glycoprotein</i>)
μ g	-micrograma
μ l	-microlitro
μ mol	-micromol
μ M	-micromolar
ng	-nanograma
nm	-nanômetro
NO	-óxido nítrico
p	-significância estatística
PBM	-proteína básica da mielina
PL/J	-linhagem de camundongos isogênicos
s	-segundo
sc	-via subcutânea
SJL/J	-linhagem de camundongos isogênicos
SNC	-sistema nervoso central
Th1	-linfócitos T <i>helper</i> tipo 1
Th2	-linfócitos T <i>helper</i> tipo 2
TNF- α	-fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
1.1. Etiologia da EM.....	1
1.2. Patogênese da EM.....	3
1.3. A encefalomielite autoimune como modelo experimental para EM.....	4
1.4. A ação biológica das isoflavonas da soja.....	6
2. Objetivos.....	10
2.1. Objetivos gerais.....	10
2.2. Objetivos específicos.....	10
3. Material e métodos.....	11
3.1. Animais.....	11
3.2. Indução da EAE.....	11
3.3. Avaliação clínica.....	11
3.4. Tratamento com genisteína.....	12
3.5. Produção de citocinas no SNC.....	13
3.6. Produção de citocinas na cultura de esplenócitos.....	13
3.7. Determinação do NO.....	14
3.8. Microscopia intravital.....	14
3.9. Análise estatística.....	15
4. Referências bibliográficas.....	16
5. Artigo.....	25
6. Anexos.....	53

1. INTRODUÇÃO

A Esclerose Múltipla (EM) afeta cerca de um milhão de pessoas em todo o mundo, caracterizando-se por ser uma doença inflamatória crônica desmielinizante do Sistema Nervoso Central (SNC) de natureza autoimune, mediada, sobretudo por linfócitos Th1 (BRADL e HOHLFELD, 2003). Basicamente, a EM apresenta quatro formas distintas: a remitente-recorrente (RR) que atinge cerca de 80% dos pacientes, onde os surtos são de duração variável, seguidos de um período de remissão e com recuperação total ou parcial; a maioria dos pacientes evolui do tipo RR para a forma secundária-progressiva (SP) na qual após a remissão dos surtos, os pacientes apresentarão leve progressão da doença; a primária-progressiva (PP) já se inicia de forma progressiva, com pouca ou nenhuma melhora dos sintomas e períodos de estabilizações; por fim, a progressiva-recorrente (PR) onde há uma progressão desde o início da incapacidade, com surtos claramente identificáveis podendo haver alguma recuperação (MCFARLAND, 1999). Os principais sintomas da EM incluem parestesias, fraqueza dos membros, neurite óptica, incoordenação motora total e parcial, tremores e incontinência urinária, segundo CARVALHO e colaboradores (2003). Apesar de inúmeras terapias isoladas e combinadas a medicamentos existirem, todas em sua maioria ainda têm sido utilizadas como paliativas no tratamento da EM e têm se mostrado ineficazes em relação à sua cura e total recuperação dos pacientes em fase avançada (SOSPEDRA e MARTIN, 2005).

1.1. Etiologia da EM

Baseado na composição das células infiltrantes do cérebro e líquido encéfalo-raquidiano, a EM é considerada uma desordem autoimune mediada por linfócitos CD4⁺ Th1 (HAFLER, 2004), embora também possa ser desencadeada por anticorpos e linfócitos

T CD8⁺ em modelos experimentais por transferência adotiva (HUSEBY *et al.*, 2001). Estudos demonstram que a EM é uma doença de etiologia multifatorial onde a predisposição genética aliada a fatores externos, inclusive infecções por vírus tais como Epstein-Barr (WANDINGER *et al.*, 2000) e Herpesvirus humano 6 (MOORE e WOLFSON, 2002), ou bacterianas como *Chlamydia pneumoniae* (SRIRAM *et al.*, 1999), seriam determinantes no desencadeamento dos eventos imunológicos relacionados a ela. Estudos de meta-análise no genoma de pacientes portadores de EM diferentes áreas geográficas mostraram que um ou mais genes presentes no cromossomo 6p21 na área do complexo de histocompatibilidade principal conferem cerca de 10 a 20% de risco genético de EM (GAMES, 2003). Além disso, de forma semelhante a outras doenças autoimunes mediadas por células T, genes HLA-DR e HLA-DQ também têm demonstrado conferir risco aos portadores (SELLEBJERG *et al.*, 2000; FERNANDEZ *et al.*, 2004).

Dentre os fatores ambientais que potencialmente influenciam no desencadeamento da EM, tem sido proposto que não somente o estilo de vida e o comportamento individual mas também variações hormonais possam contribuir ou mesmo induzir a expressão da doença (COO e ARONSON, 2004). O fato de que mulheres com EM superam o número de homens na proporção de 1.6-2.0:1 sugere que os hormônios tenham relevante importância neste contexto (SOSPEDRA e MARTIN, 2005). Observações clínicas indicam que algumas doenças autoimunes tais como EM e artrite reumatóide, freqüentemente sofrem remissão durante a gravidez, mas exacerbam ou têm seu início estabelecido no período pós-parto. Níveis farmacológicos de estrógeno também parecem melhorar essas patologias (SICOTTE *et al.*, 2002). Contribuições ambientais à etiologia da EM são baseados em diversos fatores como a maior prevalência em países do hemisfério norte em relação aos do hemisfério sul além de estudos migratórios. Trabalhos mostram que a migração de uma

área de alta prevalência para uma de baixa prevalência antes dos 16 anos de idade, leva um indivíduo a adquirir baixo risco de desenvolver EM (KURTZKE, 2005). Tem sido proposto que a exposição à luz solar e sua relação com a latitude influenciariam na modulação das respostas do tipo Th1 (HAYES, 2000).

1.2. Patogênese da EM

De acordo com RANSOHOFF e colaboradores (2003), o processo de desmielinização inicia-se com ativação de linfócitos T periféricos com reatividade à mielina, atravessando a barreira hemato-encefálica em direção ao SNC, auxiliadas não somente pelo aumento da expressão de citocinas inflamatórias como também de moléculas de adesão, integrinas e receptores de quimiocinas por células endoteliais. Citocinas e, em grande parte, quimiocinas desempenham papel essencial no estabelecimento e manutenção de processos autoimunes, agindo de forma sinérgica e redundante sobre diversos tipos celulares. Citocinas pró-inflamatórias tais como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ), interleucina-17 e interleucina-12 (IL-12) têm sido apontados por exercerem importante papel na patogênese da EM, como demonstrado em modelos experimentais (BEGOLKA E MILLER, 1998; MCKENZIE *et al.*, 2006; TAKEUCHI *et al.*, 2006). Os antígenos da mielina, sobretudo a proteína básica da mielina (PBM) e a proteína mielodendrítica (MOG), são apresentados por astrócitos, macrófagos e células gliais aos linfócitos T, desencadeando então uma cascata que acarretará na liberação de mediadores inflamatórios, culminando com a lesão ou mesmo destruição da bainha de mielina. Evidências sugerem que quimiocinas como CCL-2 e CCL-5, proteínas secretadas tanto por mononucleares infiltrantes como por células gliais residentes no SNC que regulam a

migração de leucócitos, desempenham importante papel no direcionamento e manutenção de mononucleares nos locais onde os danos à mielina se processam (SANTOS *et al.*, 2005). Apesar das pesquisas mostrarem o envolvimento de resposta imune mediada por células, a produção de auto-anticorpos tem sido demonstrada como um importante fator na desmielinização dos axônios. O aumento das concentrações de imunoglobulinas no líquido céfalo-raquidiano (LCR) e a presença de anticorpos anti-mielina indicam o envolvimento de células B (resposta humoral) no processo inflamatório. Como resultado do processo autoimune inflamatório, há prejuízo na condução dos impulsos nervosos e resistência da transmissão elétrica, segundo MARTIN e colaboradores (1992).

1.3. A encefalomielite autoimune como modelo experimental para EM

Modelos animais têm sido bastante úteis para a melhor compreensão dos processos patológicos relacionados a autoimunidade. A encefalomielite autoimune experimental (EAE) é o modelo animal mais amplamente utilizado para o estudo das doenças autoimunes humanas, especialmente da EM. Várias razões contribuem para a utilização da EAE como um modelo de autoimunidade antígeno-induzida: a) foi desenvolvida primeiramente em relação a outros modelos; b) pode ser facilmente induzida em muitas espécies; c) as manifestações clínicas, como paralisia e perda do tônus da cauda (em roedores), são perceptíveis para a maioria dos pesquisadores; d) a PBM, o auto-antígeno primário da EAE, abundante nos tecidos do SNC, é fácil de ser extraída e purificada; e) também poder ser induzida por vírus como o da encefalomielite murina de Theiler ou o coronavírus JHM em camundongos BALB/c (GRIGORIADIS e HADJIGEORGIOU, 2006).

Nos últimos anos, camundongos têm sido extremamente úteis na investigação da patogênese da EAE. Esta é caracterizada tanto pela inflamação por células mononucleares

quanto por desmielinização, características que se assemelham às da EM humana. Outra vantagem do uso de camundongos é a ampla variedade de linhagens disponíveis. Linhagens susceptíveis como a SJL/J e a PL/J não são resistentes à reindução da doença. Além disso, é possível induzir recaídas crônicas de EAE nestes animais obtendo um modelo que mais se assemelha à EM humana, de acordo com YANG (2003). Outro modelo murino, o C57Bl/6, tem sido bastante útil na indução de EAE crônica severa e sem recaídas, especialmente quando se utiliza a proteína MOG como indutora da doença. Apesar de muito menos abundante que a PBM, respondendo por cerca de 0,01%-0,05% das proteínas da mielina, a proteína MOG tem sido objeto de estudos que apóiam a possibilidade dele ser o antígeno-alvo primário no desenvolvimento da EM (MENDEL *et al.*, 1995; SOSPEDRA e MARTIN, 2005). Esta proteína pertence à superfamília das imunoglobulinas e apresenta alta homologia entre as espécies (cerca de 90%) sendo formada por uma seqüência de 218 aminoácidos (JOHNS e BERNARD, 1999; **Figura 1**). Estudos demonstram que a seqüência 35-55 de aminoácidos seja o epítipo primário durante a resposta imune na EAE (LEADBETTER *et al.*, 1998). Entretanto, sua função no SNC permanece indefinida, embora trabalhos têm sugerido que essa proteína atue não somente como molécula de adesão e receptor celular, mas também como estabilizador dos microtúbulos dos oligodendrócitos (JOHNS e BERNARD, 1999). Em relação às considerações acima e pelo fato da farmacoterapia atual desta patologia se basear na imunomodulação, estudos recentes concentram-se na análise da imunopatogênese da EAE em camundongos C57Bl/6 induzida por MOG35-55 (SANTOS *et al.* 2005).

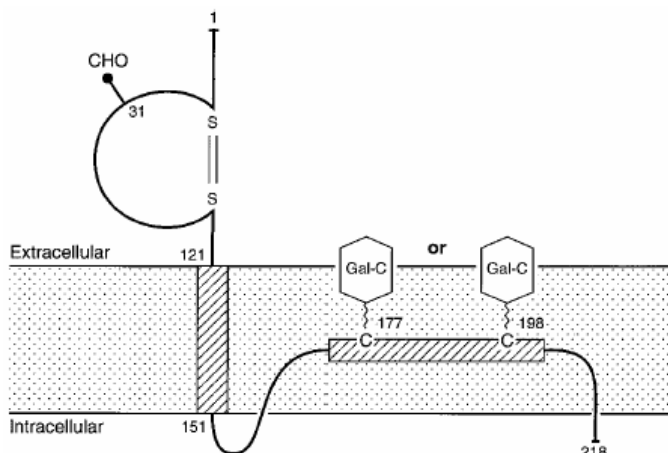


Figura 1 – Estrutura molecular da proteína MOG e sua localização celular (JOHNS e BERNARD, 1999).

1.4. Ação biológica das isoflavonas da soja

A soja representa hoje uma das principais fontes de pesquisas quando se trata do estudo de terapias alternativas de tratamento devido a seus efeitos bioquímicos e biológicos sobre doenças de caráter inflamatório não-infeccioso como osteoporose, doenças cardiovasculares, câncer de mama e próstata (FANTI *et al.*, 1998; GOTOH *et al.*, 1998). Apesar do incentivo ao consumo da soja e seus subprodutos ser relativamente recente na sociedade ocidental comparado a países como a China, a revolução na agricultura através da biotecnologia aliada à baixa incidência dessas doenças no Sudoeste da Ásia tem conduzido vários estudos *in vivo* e *in vitro*, na tentativa de demonstrar sua aplicação clínica. A ação marcante antioxidativa, antiproliferativa celular e estrogênica da soja têm sido atribuída a alguns de seus componentes, especialmente os fitoestrógenos (BARNES *et al.*, 2000; BALK *et al.*, 2005).

Estruturalmente semelhantes ao estrógeno (**Figura 2**), os fitoestrógenos representam uma família de compostos vegetais com propriedades estrogênicas, sendo que as isoflavonas são a forma mais comum de fitoestrógenos. O estrógeno representa um papel central na resposta imune e nas doenças imunomediadas (SALEM, 2004). Os receptores de

estrógeno são expressos numa variedade de células imunocompetentes incluindo linfócitos T CD4+ e CD8+, além de macrófagos. Baseando-se num perfil distinto de produção de citocinas, os dados acumulados na literatura revelaram efeitos modulatórios do estrógeno em linfócitos do tipo Th1 e Th2, que representam duas formas polarizadas da resposta imune específica efetora. De acordo com SALEM (2004), os estrógenos inibem a produção das citocinas pró-inflamatórias envolvidas na diferenciação dos linfócitos Th1 (IL-12, TNF- α e IFN- γ), enquanto que estimulam a produção de citocinas anti-inflamatórias produzidas pelos clones de linfócitos Th2 (IL-4, IL-10). Isto explica porque o estrógeno suprime e potencializa doenças mediadas por Th1 e Th2, respectivamente.

Dentre as isoflavonas da soja, destacam-se a genisteína e a daidzeína, as quais são encontradas numa variedade de plantas incluindo frutas e vegetais, sendo especialmente abundantes na soja. Nas plantas, as isoflavonas são inativas, pois se encontram ligadas a moléculas de açúcares, formando compostos denominados glicosídeos. Ao serem ingeridas, sofrem hidrólise bacteriana pela microflora intestinal para a retirada da molécula de açúcar e, assim, sob a forma de agliconas, tornam-se passíveis de serem absorvidas e sofrerem biotransformação hepática (THAM *et al.*, 1998).

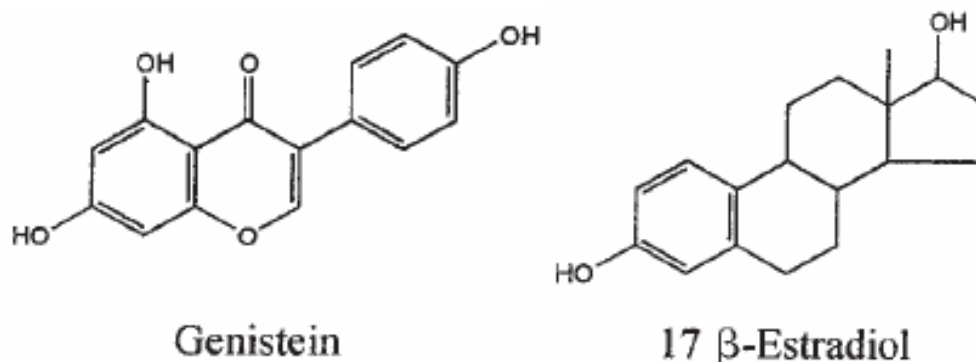


Figura 2 – Similaridades estruturais da isoflavona genisteína e do 17- β estradiol (THAM *et al.*, 1998).

De acordo com MOLL (2002), esses hormônios vegetais podem apresentar efeitos benéficos especialmente relevantes ao diminuir o risco do desenvolvimento de doenças associadas à atuação de hormônios. A prevenção de várias doenças relacionadas aos hormônios sexuais pelo aumento no consumo destes compostos vegetais pode representar uma importante terapia alternativa. Foi inclusive demonstrado que eles se ligam aos receptores de estrógenos, levando à formação de complexos que são funcionalmente equivalentes àqueles formados pela ligação do 17- β -estradiol aos seus receptores específicos (BARNES, 1998). A resposta obtida com as isoflavonas não é tão intensa quanto com o 17- β -estradiol, em função delas terem uma menor afinidade pelos receptores estrogênicos. Esta variação depende do tipo de receptor estrogênico (α e β) presente no tecido ou órgão específico. A afinidade das isoflavonas é marcante em relação aos receptores do tipo β e pouco pronunciada em relação aos do tipo α . Portanto, supõe-se que suas ações são mais marcantes naqueles órgãos e tecidos nos quais os receptores β predominam (SNC, ossos, parede vascular e trato urogenital) (KUIPER *et al.*, 1998).

Muitos dos benefícios potenciais dos fitoestrógenos podem ser atribuíveis a propriedades metabólicas que não envolvem os receptores de estrógeno tais como sua influência sobre enzimas, sobre a proliferação celular, a angiogênese, o transporte de cálcio, a oxidação lipídica e a diferenciação celular (POLKOWSKI, 2000; GOSSNER *et al.*, 2007). Estudos com animais e ensaios clínicos envolvendo humanos têm sugerido que os benefícios à saúde podem ocorrer em várias áreas, como diminuição dos níveis de colesterol sanguíneo, aumento da função endotelial, inibição de vários estágios de iniciação ou progressão do câncer, promoção da conservação da massa óssea, influência favorável nos sintomas menstruais e da menopausa, entre outros (LISSIN e COOKE, 2000; BHATHENA e VELASQUEZ, 2002). Segundo BARNES e colaboradores (1996), estes

achados estão de acordo com as observações epidemiológicas de que níveis elevados de consumo de soja e seus produtos estão associados à baixa incidência de doença cardiovascular, câncer e osteoporose, tanto em homens quanto em mulheres.

Em 2002, YELLAYI e colaboradores mostraram que camundongos adultos castrados, tratados com a isoflavona genisteína, apresentaram uma marcante atrofia do timo, diminuição do número de timócitos em até 86% e duplicação da apoptose destas células. A genisteína também produziu supressão da imunidade humoral e linfocitopenia sistêmica, demonstrando a atuação das isoflavonas no sistema imune, o que as torna potencialmente aplicáveis na terapia de patologias inflamatórias autoimunes.

Recentes estudos experimentais utilizando compostos de origem não-sintética como flavonóides (quercetina e luteolina), vitamina D, proteínas de origem animal (crotapotina) e outros fitoestrógenos (resveratrol) têm demonstrado efeitos benéficos na reversão da EAE, pelo menos em parte (GARCIA *et al.*, 2003; HENDRICKS *et al.*, 2004; PEDERSEN *et al.*, 2007; SINGH *et al.*, 2007). Tais trabalhos destacam a importância da obtenção de terapias que melhor se apliquem aos portadores de EM relação àquelas que atualmente são por eles utilizadas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral:

Avaliar os efeitos da isoflavona genisteína em modelo murino de EAE e seus mecanismos de imunomodulação mediados por linfócitos Th1 e Th2.

2.2. Objetivos específicos:

-Induzir o modelo de EAE em camundongos isogênicos C57Bl6 utilizando a proteína MOG;

-Avaliar o tratamento da isoflavona genisteína na EAE, através dos seguintes parâmetros:

- Clínico: score clínico e medidas de peso;
- Laboratorial: (a) produção de citocinas no SNC; (b) produção de citocinas no sobrenadante de cultura de esplenócitos; (c) produção de óxido nítrico (NO) no SNC; (d) rolamento e adesividade dos leucócitos à microvasculatura do SNC.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem C57Bl/6 fêmeas, com 8-12 semanas, provenientes do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). Eles permaneceram na sala de manutenção de animais do Laboratório de Imunologia, em estantes climatizadas e dieta *ad libitum*. Todos os procedimentos estiveram de acordo com os princípios do Código Brasileiro para a Utilização de Animais de Laboratório. Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais da UFJF sob o número 045/2005-CEA.

3.2. Indução da EAE

Os animais (6-12) foram imunizados por via subcutânea (s.c.) em ambos os lados da base da cauda com 100 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ (Sigma Chemical Co., Saint Louis, EUA) e adjuvante completo de Freund (Sigma) suplementado com 400 µg de *Mycobacterium tuberculosis* (H37RA; Difco Laboratories, Detroit, EUA). No dia da imunização e após 48 horas, foram injetados intraperitonealmente (i.p.) 300 ng de toxina pertussis (Sigma). Os animais imunizados foram subdivididos randomicamente em dois grupos, dos quais um foi submetido ao tratamento com genisteína.

3.3. Avaliação clínica

Os animais foram pesados diariamente antes e após a imunização, sendo clinicamente avaliados e classificados de acordo com a **Tabela 1**, seguindo uma escala arbitrária. Os animais tiveram suas patas anteriores, posteriores, cauda e bexiga avaliadas

individualmente. Em caso de morte, seria aplicado escore 15. O escore clínico final de cada animal foi obtido somando-se todos os escores individuais.

Tabela 1 – Avaliação dos sinais clínicos

Parte do corpo	Sinais clínicos	Escore*
Cauda	sem sinais clínicos	0
	perda do tônus da cauda	1
	paralisia	2
Patas traseiras	sem sinais clínicos	0
	fraqueza de uma pata	1
	fraqueza de ambas as patas	2
	paralisia de uma pata	3
	paralisia de ambas as patas	4
Patas dianteiras	sem sinais clínicos	0
	fraqueza de uma ou ambas as patas	1
	paralisia de uma ou ambas as patas	2
Bexiga	continência	0
	incontinência	1

*Escore numérico arbitrariamente determinado

3.4. Tratamento com genisteína

Após padronização do modelo de EAE, grupos de 3-6 animais foram alimentados *ad libitum* com uma dieta livre de fitoestrógenos. Em um dos grupos imunizados com MOG₃₅₋₅₅, foi aplicada a isoflavona genisteína (Indofine Chemicals, Somerville, EUA) 14 dias após a indução de EAE, ou seja, após o estabelecimento do processo inflamatório neurológico, evidenciado pelos sinais clínicos de EAE. Foram administrados 200 mg/kg/dia s.c. durante 7 dias (YELLAYI *et al.*, 2002).

3.5. Produção de citocinas no SNC

Os animais foram sacrificados com dose letal de xilazina e quetamina i.p., e o tecido cerebral foi obtido dos grupos de animais 21 dias pós-imunização (dpi). Os cérebros foram removidos após a microscopia intravital, e os hemisférios foram conservados a 5 °C. Em seguida, os hemisférios foram homogeneizados em solução extratora (100 mg de tecido/ml), contendo: 0,4 M de NaCl, 0,05% de tween 20 (Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, EUA), 0,5% de soro-albumina bovina (BSA), 0,1 M de fluoreto de fenil-metil-sulfonil (PMSF), 0,1 M de cloreto de benzetônio, 10 mM de ácido etileno diamino tetracético (EDTA) e 20 kIU/mL de aprotinina (Sigma), utilizando uma Ultra-Turrax (IKA Works, Wilmington, EUA). O homogeneizado de tecido cerebral foi centrifugado a 10.000 x g por 10 min a 4 °C e os sobrenadantes foram coletados e congelados a -70 °C. A concentração de IFN- γ , TNF- α , IL-12p40 e IL-10 nos sobrenadantes de extrato de cérebro, na diluição de 1:10 em 1% de BSA em tampão salina-fosfato (PBS), foi determinada pelo método ELISA utilizando anticorpos e concentrações comercialmente disponíveis de acordo com os procedimentos recomendados pelo fabricante (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, EUA).

3.6. Produção de citocinas na cultura de esplenócitos

Suspensões de esplenócitos foram realizadas 21 dpi. As células foram cultivadas na densidade de 2×10^5 /poço em meio RPMI 1640 suplementado com 5% de soro fetal bovino inativado pelo calor, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina e 100 μ g/ml de estreptomicina (RPMI 5%, Sigma), em câmara húmida, a 37° C e em atmosfera de 5% de CO₂. As culturas foram estimuladas com MOG₃₅₋₅₅ na concentração de 10 μ g/ml,

concanavalina A (Sigma) a 10 $\mu\text{g/ml}$, ou genisteína a 10 $\mu\text{g/ml}$. Sobrenadantes foram coletados após 48 h e a dosagem de IFN- γ , IL-10 e TNF- α foi determinada por ELISA de acordo com os procedimentos recomendados pelo fabricante (BD Biosciences Pharmingen).

3.7. Determinação do NO

O preparo dos lisados e a determinação do nitrito foi realizado de acordo com Frank *et al.* (1998) com modificações. Resumidamente, os cérebros foram homogeneizados e centrifugados a 10.000 $\times g$ por 30 min a 4 °C; os sobrenadantes foram transferidos para frascos contendo 50% de ácido tricloroacético (Synth, São Paulo, Brasil) em água deionizada. Após precipitação, as amostras foram centrifugadas novamente por 1 min (10.000 $\times g$, 4 °C) e os sobrenadantes foram coletados para determinação do NO pelo método de Griess (LIU *et al.*, 1997). A reação foi realizada em duplicata, utilizando-se 50 μl de cada amostra com 50 μl de reagente de Griess (0,1% de naftil-etilenodiamino [NEED] e 1% de sulfanilamida em 2,5% de ácido fosfórico, Sigma). Após 10 min de incubação em temperatura ambiente, as placas foram lidas a 540 nm (Titertek Multiskan Plus, Lugano, Suíça) e a concentração do NO foi calculada utilizando-se uma curva-padrão na faixa de 0,2 a 200 μM de nitrito de sódio.

3.8. Microscopia intravital

A microscopia intravital da microvasculatura cerebral dos animais foi realizada de acordo com Carvalho-Tavares *et al.* (2000). Resumidamente, os animais foram anestesiados com quetamina (150 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) i.p., e a veia caudal foi

canulada para a administração de substâncias fluorescentes. A craniotomia foi desenvolvida utilizando-se uma broca de alta velocidade (Dremel, New York, EUA) e a dura mater foi removida para exposição da vasculatura da pia mater. Durante todo o experimento, os animais foram mantidos a 37°C com uma placa de aquecimento (Fine Science Tools Inc., North Vancouver, Canadá) e o cérebro exposto foi continuamente perfundido com solução tampão artificial de LCR, em uma composição iônica contendo: 132 mmol/L de NaCl, 2,95 mmol/L de KCl, 1,71 mmol/L de CaCl₂, 0,64 mmol/L de MgCl₂, 24,6 mmol/L de NaHCO₃, 3,71 mmol/L de dextrose e 6,7 mmol/L de uréia; pH 7,4, a 37 °C. Para observar as interações dos leucócitos com o endotélio, os leucócitos foram marcados por fluorescência pela administração de rodamina 6G (0,5 mg/kg) e visualizados por microscópio B201 (Olympus, New York, EUA), lentes objetivas X20 (Olympus), correspondendo a 100 Am de área, equipado com fonte de luz fluorescente (epi-iluminação a 510–560 nm, utilizando um filtro de emissão de 590 nm). Uma câmera DEI-470 (Optronics Engineering, Goleta, EUA) instalada ao microscópio projetou a imagem no monitor (Olympus). Leucócitos em rolamento foram definidos como células brancas movendo-se a uma velocidade menor que a dos eritrócitos. Leucócitos em aderência foram considerados aderentes ao endotélio venoso quando estacionários por 30 s ou mais.

3.9. Análise estatística

Os resultados foram representados por média \pm erro-padrão. Foram utilizados *two-way* ANOVA para as análises de peso e escore clínico, e *one-way* ANOVA para as demais determinações, seguidos por teste de comparações múltiplas de Bonferroni (GraphPad Prism 5.00). As diferenças foram consideradas significantes para $p < 0,05$.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALK, E.; CHUNG, M.; CHEW, P.; IP, S.; RAMAN, G.; KUPELNICK, B.; TATSIONI, A.; SUN, Y.; WOLK, B.; DEVINE, D.; LAU, J. Effect of soy on health outcomes. **Evidence Report/Technology Assessment (Summ)**, v. 126, p. 1-8, 2005.

BARNES, S. Phytoestrogens and breast cancer. **Baillieres Clin Endocrinol Metab**, v. 12, n. 4, p. 559-79, 1998.

BARNES, S.; BOERSMA, B.; PATEL, R.; KIRK, M.; DARLEY-USMAR, V.M.; KIM H, XU J. Isoflavonoids and chronic disease: mechanisms of action. **Biofactors**, v. 12, n. 1-4, p. 209-215, 2000.

BARNES, S.; SFAKIANOS, J.; COWARD, L.; KIRK, M. Soy isoflavonoids and cancer prevention. Underlying biochemical and pharmacological issues. **Advances in Experimental Medical Biology**, v. 401, p. 87-100, 1996.

BEGOLKA, W.S.; MILLER, S.D. Cytokines as intrinsic and exogenous regulators of pathogenesis in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Res Immunol**, v. 149, n. 9, p. 771-781, 1998.

BHATHENA, S.J.; VELASQUEZ, M.T. Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, n. 6, p. 1191-1201, 2002.

BRADL, M.; HOHLFELD, R. Molecular pathogenesis of neuroinflammation. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, v. 74, n. 10, p. 1364-1370, 2003.

CARVALHO, A.; SANT'ANNA, G.; SANTOS, C.C.; FRUGULHETTI, I.P.; LEON, S.A.; QUÍRICO-SANTOS, T. Determinação de autoanticorpos para antígenos da mielina no soro de pacientes HLA - DQB1*0602 com esclerose múltipla. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 61, p. 968-973, 2003.

CARVALHO-TAVARES, J.; HICKEY, M.J.; HUTCHISON, J.; MICHAUD, J.; SUTCLIFFE, I.T.; KUBES, P. A role for platelets and endothelial selectins in tumor necrosis factor- α -induced leukocyte recruitment in the brain microvasculature. **Circ Res**, v. 87, n. 12, p. 1141-1148, 2000.

COO, H.; ARONSON, K.J. A Systematic Review of Several Potential Non-Genetic Risk Factors for Multiple Sclerosis. **Neuroepidemiology**, v. 23, n. 1-2, p. 1-12, 2004.

DOS SANTOS, A.C.; BARSANTE, M.M.; ARANTES, R.M.; BERNARD, C.C.; TEIXEIRA, M.M.; CARVALHO-TAVARES, J. CCL2 and CCL5 mediate leukocyte adhesion in experimental autoimmune encephalomyelitis--an intravital microscopy study. **J Neuroimmunol**, v. 162, n. 1-2, p. 122-129, 2005.

FANTI, P.; MONIER-FAUGERE, M.C.; GENG, Z.; SCHMIDT, J.; MORRIS, P.E.; COHEN, D.; MALLUCHE, H.H. The phytoestrogen genistein reduces bone loss in short-term ovariectomized rats. **Osteoporosis International**, v. 8, n. 3, p. 274-281, 1998.

FERNANDEZ, O.; FERNANDEZ, V.; ALONSO, A.; CABALLERO, A.; LUQUE, G.; BRAVO, M.; LEON, A.; MAYORGA, C.; LEYVA, L.; RAMON, E. DQB1*0602 allele shows a strong association with multiple sclerosis in patients in Malaga, Spain. **Journal of Neurology**, v. 251, n. 4, p. 440-444, 2004.

FRANK, S.; KOLB, N.; WERNER, E.R.; PFEILSCHIFTER, J. Coordinated induction of inducible nitric oxide synthase and GTP-cyclohydrolase I is dependent on inflammatory cytokines and interferon-gamma in HaCaT keratinocytes: implications for the model of cutaneous wound repair. **J Invest Dermatol**, v. 111, n. 6, p. 1065-1071, 1998.

GAMES, TRANSATLANTIC MULTIPLE SCLEROSIS GENETICS COOPERATIVE. A meta-analysis of whole genome linkage screens in multiple sclerosis. **J Neuroimmunol**, v. 143, n. 1-2, p. 39-46, 2003.

GARCIA, F.; LA HOZ, C.; TOYAMA, M.H.; FARIAS, A.S.; REIS, J.R.; LANGONE, F.; MARANGONI, S.; SANTOS, L.M.B. **Crotapotin, a snake venom protein, as therapeutic target approach to prevent the experimental autoimmune encephalomyelitis.** (Dissertação).Campinas, São Paulo; Universidade de Campinas, 2003.

GOSSNER, G.; CHOI, M.; TAN, L.; FOGOROS, S.; GRIFFITH, K.A.; KUENKER, M.; LIU, J.R. Genistein-induced apoptosis and autophagocytosis in ovarian cancer cells. **Gynecol Oncol**, v. 105, n. 1, p. 23-30, 2007.

GOTOH, T.; YAMADA, K.; ITO, A.; YIN, H.; KATAOKA, T.; DOHI, K. Chemoprevention of N-nitroso-N-methylurea-induced rat mammary cancer by miso and tamoxifen, alone and in combination. **Japanese of Cancer Research**, v. 89, n. 5, p. 487-495, 1998.

GRIGORIADIS, N.; HADJIGEORGIOU, G. Virus-mediated autoimmunity in Multiple Sclerosis. **Journal of Autoimmune Diseases**, v. 3, n. 1, p. 1-8, 2006.

HAFNER, D.A. Multiple sclerosis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 6, p. 788-794, 2004.

HAYES, C.E. Vitamin D: a natural inhibitor of multiple sclerosis. **Proc Nutr Soc**, v. 59, n. 4, p. 531-535, 2000.

HENDRIKS, J.J.A.; ALBLAS, J.; VAN DER POL, S.M.A.; VAN TOL, E.A.F.; DIJKSTRA, C.D.; DE VRIES, H.E. Flavonoids Influence Monocytic GTPase Activity and Are Protective in Experimental Allergic Encephalitis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 200, n. 12, p. 1667-1672, 2004.

HUSEBY, E.S.; LIGGITT, D.; BRABB, T.; SCHNABEL, B.; OHLEN, C.; GOVERMAN, J. A Pathogenic Role for Myelin-specific CD8⁺ T Cells in a Model for Multiple Sclerosis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 194, n. 5, p. 669-676, 2001.

JOHNS, T.G.; BERNARD, C.C.A. The Structure and Function of Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein. **Journal of Neurochemistry**, v. 72, n. 1, p. 1-9, 1999.

KUIPER, G.G.J.M.; LEMMEN, J.G.; CARLSSON, B.; CORTON, J.C.; SAFE, S.H.; VAN DER SAAG, P.T.; VAN DER BURG, B.; GUSTAFSSON, J.A. Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor {beta}. **Endocrinology**, v. 139, n. 10, p. 4252-4263, 1998.

KURTZKE, J.F. Epidemiology and etiology of multiple sclerosis. **Phys Med Rehabil Clin N Am**, v. 16, n. 2, p. 327-349, 2005.

LEADBETTER, E.A.; BOURQUE, C.R.; DEVAUX, B.; OLSON, C.D.; SUNSHINE, G.H.; HIRANI, S.; WALLNER, B.P.; SMILEK, D.E.; HAPP, M.P. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Induced with a Combination of Myelin Basic Protein and Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein is Ameliorated by Administration of a Single Myelin Basic Protein Peptide. **The Journal of Immunology**, v. 161, n. 1, p. 504-512, 1998.

LISSIN, L.W.; COOKE, J.P. Phytoestrogens and cardiovascular health. **J Am Coll Cardiol**, v. 35, n. 6, p. 1403-1410, 2000.

MARTIN, R.; MCFARLAND, H.F.; MCFARLIN, D.E. Immunological Aspects of Demyelinating Diseases. **Annual Review of Immunology**, v. 10, n. 1, p. 153-187, 1992.

MCFARLAND, H.F. Correlation between MR and Clinical Findings of Disease Activity in Multiple Sclerosis. **American Journal of Neuroradiology**, v. 20, n. 10, p. 1777-1778, 1999.

MCKENZIE, B.S.; KASTELEIN, R.A.; CUA, D.J. Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. **Trends Immunol**, v. 27, n. 1, p. 17-23, 2006.

MENDEL, I.; KERLERO DE ROSBO, N.; BEN-NUN. A. Delineation of the minimal encephalitogenic epitope within the immunodominant region of myelin oligodendrocyte glycoprotein: diverse V beta gene usage by T cells recognizing the core epitope encephalitogenic for T cell receptor V beta b and T cell receptor V beta a H-2b mice. **Eur J Immunol**, v. 26, n. 10, p. 2470-2479, 1996.

MOLL, M.C.N. Phytoestrogens: Basic Aspects. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology**, v. 24, p. 51-52, 2002.

MOORE, F.G.A.; WOLFSON, C. Human herpes virus 6 and multiple sclerosis. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 106, n. 2, p. 63-83, 2002.

RANSOHOFF, R.M.; KIVISAKK, P.; KIDD, G. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 7, p. 569-581, 2003.

PEDERSEN, L.B.; NASHOLD, F.E.; SPACH, K.M.; HAYES, C.E. 1,25-dihydroxyvitamin D3 reverses experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting chemokine synthesis and monocyte trafficking. **J Neurosci Res**, v. 85, n. 11, p. 2480-2490, 2007.

POLKOWSKI, K.; MAZUREK, A.P. Biological properties of genistein. A review of in vitro and in vivo data. **Acta Pol Pharm**, v. 57, n. 2, p. 135-55, 2000.

SALEM, M.L. Estrogen, a Double-Edged Sword: Modulation of TH1- and TH2-Mediated Inflammations by Differential Regulation of TH1/TH2 Cytokine Production. **Current Drug Targets-Inflammation and Allergy**, v. 3, n. 1, p. 97-104, 2004.

SELLEBJERG, F.; JENSEN, J.; MADSEN, H.O.; SVEJGAARD, A. HLA DRB1*1501 and intrathecal inflammation in multiple sclerosis. **Tissue Antigens**, v. 55, n. 4, p. 312-318, 2000.

SICOTTE, N.L.; LIVA, S.M.; KLUTCH, R.; PFEIFFER, P.; BOUVIER, S.; ODESA, S.; WU, T.C.; VOSKUHL, R.R. Treatment of multiple sclerosis with the pregnancy hormone estriol. **Ann Neurol**, v. 52, n. 4, p. 421-428, 2002.

SINGH, N.P.; HEGDE, V.; HOFSETH, L.J.; NAGARKATTI, M.; NAGARKATTI, P. Resveratrol (trans-3,5,4'-trihydroxystilbene) Ameliorates Experimental Allergic Encephalomyelitis (EAE) Primarily via Induction of Apoptosis in T cells Involving Activation of AhR and ER. **Molecular Pharmacology**, *in press*, 2007.

SOSPEDRA, M.; MARTIN, R. Immunology of multiple sclerosis. **Annual Review of Immunology**, v. 23, n. 1, p. 683-747, 2005.

SRIRAM, S.; STRATTON, C.W.; YAO, S.; THARP, A.; DING, L.; BANNAN, J.D.; MITCHELL, W.M. Chlamydia pneumoniae infection of the central nervous system in multiple sclerosis. **Ann Neurol**, v. 46, n. 1, p. 6-14, 1999.

TAKEUCHI, H.; WANG, J.; KAWANOKUCHI, J.; MITSUMA, N.; MIZUNO, T.; SUZUMURA, A. Interferon-gamma induces microglial-activation-induced cell death: a hypothetical mechanism of relapse and remission in multiple sclerosis. **Neurobiol Dis.**, v. 22, n. 1, p. 33-39, 2006.

THAM, D.M.; GARDNER, C.D.; HASKELL, W.L. Potential Health Benefits of Dietary Phytoestrogens: A Review of the Clinical, Epidemiological and Mechanistic Evidence. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 83, n. 7, p. 2223-2235, 1998.

YANG, J. **Peripheral immune response in chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL mice.** (Dissertação). Helsinki, Finland; University of Helsinki, 2003.

YELLAYI, S.; NAAZ, A.; SZEWCZYKOWSKI, M.A.; SATO, T.; WOODS, J.A.; CHANG, J.; SEGRE, M.; ALLRED, C.D.; HELFERICH, W.G.; COOKE, P.S. The phytoestrogen genistein induces thymic and immune changes: A human health concern? **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 11, p. 7616-7621, 2002.

WANDINGER, K.P.; JABS, W.; SIEKHAUS, A.; BUBEL, S.; TRILLENBERG, P.;
WAGNER, H.J.; WESSEL, K.; KIRCHNER, H.; HENNIG, H. Association between
clinical disease activity and Epstein-Barr virus reactivation in MS. **Neurology**, v. 55, n. 2,
p. 178-184, 2000.

5. ARTIGO

Considerações

O artigo **“Genistein down-modulates proinflammatory cytokines and reverses clinical signs of experimental autoimmune encephalomyelitis”** dos autores Marcio L. De Paula, David H. Rodrigues, Henrique C. Teixeira, Michele M. Barsante, Maria A. Souza, Ana P. Ferreira foi submetido à apreciação dos revisores da *Multiple Sclerosis Journal* em 23/10/2007 (vide ANEXO).

Multiple Sclerosis Journal tem como foco não somente a etiologia e a patogênese de doenças inflamatórias e desmielinizantes do sistema nervoso central como também a aplicação de tais estudos em terapias cientificamente comprovadas. Esta revista britânica aborda áreas de pesquisa experimentais e em humanos relacionadas à Clínica Neurológica, Neuroimagem, Epidemiologia, Patologia, Terapêutica, Genética, Imunologia, dentre outras. Apresenta fator de impacto 2,773 (2006), ISSN: 1352-4585.

Genistein down-modulates proinflammatory cytokines and reverses clinical signs of experimental autoimmune encephalomyelitis

Marcio L. De Paula^a, David H. Rodrigues^b, Henrique C. Teixeira^a, Michele M. Barsante^a,
Maria A. Souza^{a*}, Ana P. Ferreira^a.

^aDepartamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

^bDepartamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

*Corresponding author: Maria Aparecida de Souza

Laboratório de Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas,

Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Martelos

36036-330 Juiz de Fora, M.G., Brazil

Tel: +55 32 32293214; Fax: + 55 32 32293214.

E-mail address: masouza.icb@ufjf.edu.br

Abstract

MS is the most common non-traumatic, disabling neurological human inflammatory demyelinating disease of the CNS. Experimental autoimmune encephalomyelitis models MS and is characterized as a CD4⁺ Th1 cell-mediated autoimmune disease. It is characterized by an influx of activated leukocytes into the CNS. Genistein, occurring abundantly in soy products, has apoptotic, antioxidant, and anti-inflammatory properties. In the present report, we investigated the use of genistein for the treatment of the murine model of MS. After induction of EAE with MOG₃₅₋₅₅, we observed that genistein treatment ameliorated significantly the clinical symptoms, modulating pro- and anti-inflammatory cytokines. Moreover, we analysed the leukocyte rolling and adherence in the CNS by performing intravital microscopy. Genistein treatment resulted in decreased rolling and adhering of leukocytes as compared to the untreated group. Our data suggest that genistein might be a potential therapy for MS.

Introduction

MS is a chronic inflammatory disorder of the CNS with unknown etiology affecting approximately 2.5 million people worldwide, predominantly in Western countries.^{1, 2} A complex predisposing genetic trait and an inciting environmental insult such as infections agents appears to be important in triggering the disease, comprising as hallmarks inflammation, demyelination and axonal damage.^{1, 3} Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is the best-known animal model of MS and can be induced in mice by immunization with myelin antigens such as myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG). Due to its similarity to MS, EAE has been used as an animal model for proof of concept studies of MS therapy.

Cytokines and to some extent chemokines play a pivotal role in the establishment and maintenance of autoimmune disorders, acting in highly complex networks, and often exert overlapping and in part redundant functions by different cell types. Proinflammatory cytokines such as tumor necrosis factor- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ), interleukin-17 and interleukin-12 (IL-12) are thought to play a role in the pathogenesis of MS.^{4, 5} Chemokines are produced by both infiltrating immune cells and CNS-resident glial cells. They regulate the recruitment of the autoaggressive T cells and mediate local inflammatory reactions.⁶ Yet gender differences in the cellular and humoral immune responses may influence the development and function of pathogenic T cells as well as the induction of cytokine expression.^{7, 8}

Both clinical and experimental evidence suggests that sex hormones in males and females are significant factors responsible for the sexual dimorphism in the immune response. The best-studied regulatory hormone, estrogen, is protective against the induction

of EAE, demonstrating several immunosuppressive mechanisms by not only expanding CD4⁺CD25⁺ T cells but also inhibiting expression of certain chemokines and Th1 proinflammatory cytokines.^{9, 10} Phytoestrogens are a group of biologically active plant substances with a chemical structure similar to estrogen, which account for their ability to bind to estrogen receptors in various cells and exert estrogenic and anti-estrogenic effects.¹¹ Accumulated evidence suggests that the consumption of phytoestrogens leads to protective effects against menopausal symptoms and a variety of disorders, including cardiovascular disease, diabetes and cancer.¹²⁻¹⁴

Isoflavones make up the most common form of phytoestrogens and are found in a variety of plants, especially in soy.¹⁵ Genistein is the major bioactive isoflavone, demonstrating a variety of properties such as induction of apoptosis and differentiation in cancer cells, cell proliferation inhibition and antioxidant effects.^{16, 17} However, little has been elucidated with regard to its potential in autoimmune diseases caused by T cell activation.

The concept of MS as an autoimmune inflammatory disease is supported by the response to immunomodulatory and suppressive treatments. Interferon- β (IFN- β) has been approved for treatment of relapsing-remitting-MS and is currently the agent that is most broadly used. IFN- β reduces exacerbation by only 30% and has a modest impact on disease progression. It is a clear step forward in MS therapy, but the frequency of subcutaneous (s.c.) injections of IFN- β , the flu-like symptoms that occur at the beginning of therapy, the modest activity required of patients, and the treatment failures are all reasons to search for better agents.⁵

In this report, we sought to determine the clinical and biological effects of isoflavone genistein on MOG-induced EAE model. Our data show that genistein ameliorates EAE not only by reducing significantly the EAE severity but also by modulating cytokine profile and modifying leukocyte entry into the CNS. The results shed more light on potential alternative therapies that might be applied to disorders such as MS.

Materials and methods

Animals

Female C57Bl/6 mice were obtained from the Animal Care Facilities of the Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), between 8-12 weeks of age, and housed in microisolator cages in the animal facility at the laboratory of immunology. All procedures were in accordance with the principles of the Brazilian Code for the Use of Laboratory Animals. This project was approved by the Ethics Committee on the use of laboratory animals from UFJF.

EAE induction

Groups of 3-6 animals were immunized s.c. at both sides of the tail base with 100 µg of myelin oligodendrocyte glycoprotein 35-55 peptide (MOG₃₅₋₅₅; Sigma Chemical Co., Saint Louis, USA) emulsified vol/vol in complete Freund's adjuvant (CFA) (Sigma) supplemented with 400 µg of attenuated *Mycobacterium bovis* H37 RA (Difco, Detroit, USA). Pertussis toxin, 300 ng/animal (Sigma), was injected intraperitoneally (i.p.) on the day of immunization and again 48 h later. Animals were monitored daily and neurological impairment was quantified on an arbitrary clinical scale.

Clinical assessment

Mice were weighed and observed daily for clinical signs of EAE up to 21 days post-immunization (dpi). The clinical status was assessed scoring certain parts of the mice body individually according to Table 1. In case of death, mice were scored 15. The final clinical score was obtained adding all individual scores assessed.

Treatment with genistein

Mice were immunized and then divided into two groups. One received no treatment while the other was given 200 mg/kg body weight of genistein (Indofine Chemical Co., Hillsborough, USA) s.c. on daily basis.¹⁸ The treatment was introduced 14 dpi for 7 days.

Cytokine production in the CNS

Brain tissue extracts were acquired from control and experimental mice that were sacrificed by ketamine and xylazine overdose i.p. at 21 dpi. Brains were removed after intravital microscopy, and hemispheres were stored on ice. Thereafter, the hemispheres were homogenized in extraction solution (100 mg of tissue per 1 ml), containing: 0.4 M NaCl, 0.05% tween 20 (Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, USA), 0.5% bovine serum albumine (BSA), 0.1 M phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), 0.1 M benzethonium chloride, 10 mM ethylenediaminetetracetic acid (EDTA) and 20 kIU/mL aprotinin (Sigma), using Ultra-Turrax (IKA Works, Wilmington, USA). Brain homogenate was spun at 10,000 x g for 10 min at 4 °C and supernatants were collected and stored -70 °C. The concentration of IFN- γ , TNF- α , IL-12p40 and IL-10 in the supernatants of brain extraction, at 1:10 dilution in 1% BSA in phosphate buffered saline (PBS), were assayed in an ELISA

set-up using commercially available antibodies and the concentrations according to the procedures supplied by the manufacturer (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA).

Nitric Oxide (NO) assay

Preparation of lysates and nitrite determination were done according to Frank *et al.* with modifications.¹⁹ Briefly, the brain was homogenized and centrifuged at 10,000 ×g for 30 min at 4 °C, after which the supernatant was transferred to a fresh tube and mixed with 50 percent trichloroacetic acid (Synth, São Paulo, Brazil) in deionized water. After precipitation, the samples were centrifuged again for 1 minute (10,000 ×g, 4 °C) and the supernatant was collected for NO detection assay by the Griess method as follows.²⁰ The reaction was done in duplicate wells by mixing 50 µl of each sample with 50 µl of Griess reagent (0.1% naphthyl-ethylenediamine [NEED] and 1% sulfanilamide in 2.5% phosphoric acid, Sigma). After 10-minute incubation at room temperature, the plates were read at 540 nm (Titertek Multiskan Plus, Lugano, Switzerland) and NO concentration was calculated using a standard curve ranging from 0.2 to 200 µM of sodium nitrite.

Splenocyte culture

Suspensions of splenocytes were prepared on day 21. Cells were cultured at a density of 2 x 10⁵/well in RPMI 1640 medium supplemented with 5% heat-inactivated fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (RPMI 5%, Sigma), in a humidified incubator, at 37° C and 5% CO₂ atmosphere. Cultures were stimulated with MOG₃₅₋₅₅ peptide at the final concentration of 10 µg/ml, concanavalin A (Sigma) at 10 µg/ml, or genistein at 10 µg/ml. Supernatants were collected after 48 h and a

quantitative ELISA was performed for IFN- γ , IL-10 and TNF- α according to the manufacturer's recommendation (BD Biosciences Pharmingen).

Intravital microscopy

Intravital microscopy of the mouse cerebral microvasculature was performed as previously described.²¹ Briefly, the mice were anesthetized by i.p. injection of a mixture containing 150 mg/kg ketamine and 10 mg/kg xylazine and the tail vein was cannulated for administration of fluorescent dyes. A craniotomy was performed using a high-speed drill (Dremel, New York, USA) and the dura matter was removed to expose the underlying pial vasculature. Throughout the experiment, the mouse was maintained at 37 °C with a heating pad (Fine Science Tools Inc., North Vancouver, Canada) and the exposed brain was continuously superfused with artificial CSF buffer, an ionic composition containing, in mmol/L: NaCL 132, KCL 2.95, CaCL₂ 1.71, MgCL₂ 0.64, NaHCO₃ 24.6, dextrose 3.71 and urea 6.7; pH 7.4, at 37 °C. To observe leukocyte-endothelium interactions, leukocytes were fluorescently labeled by intravenous administration of rhodamine 6G (0.5 mg/kg body weight) and observed using a microscope B201 (Olympus, New York, USA), X20 objective lens (Olympus), corresponding to 100 μ m of area, outfitted with a fluorescent light source (epi-illumination at 510–560 nm, using a 590-nm emission filter). A silicon-intensified camera DEI-470 (Optronics Engineering, Goleta, USA) mounted on the microscope projected the image onto a monitor (Olympus). Rolling leukocytes were defined as white cells moving at a velocity less than that of erythrocyte cells. Leukocytes were considered adherent to the venular endothelium if they remained stationary for 30 s or longer.

Statistical analysis

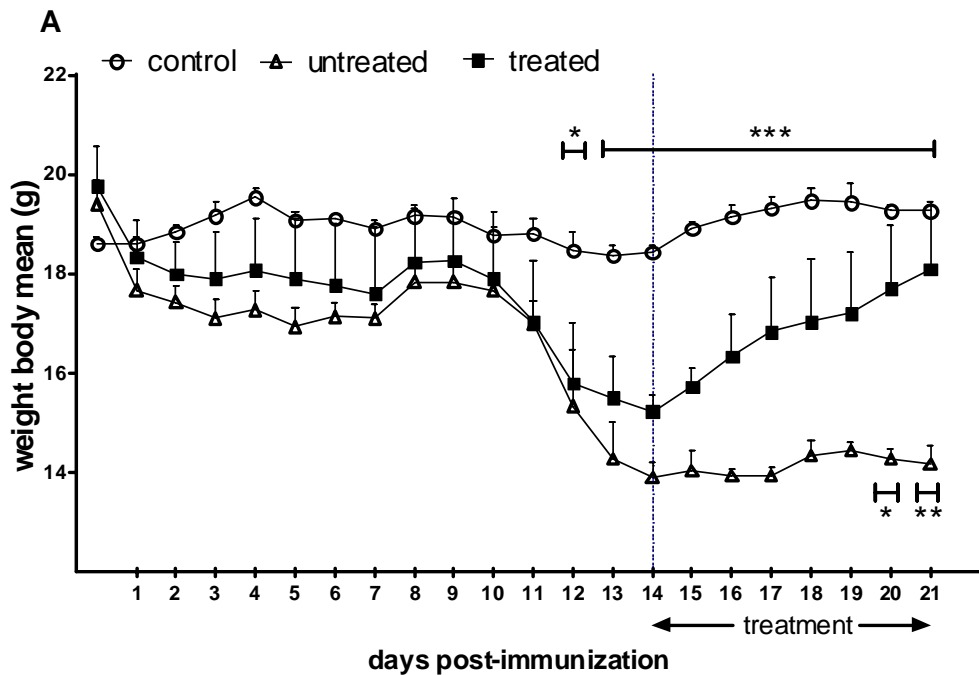
Results presented here represent at least two independent experiments and are presented as the mean \pm SEM. For clinical score and weight measurement analysis, two-way ANOVA was performed while the others were assessed by one-way ANOVA. All analyses were followed by the Bonferroni Multiple Comparison test (GraphPad Prism 5.00), and the differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results

Treatment with genistein ameliorates the EAE clinical course

The initial clinical expression of the axonal damage in an EAE model is represented by well-defined signs such as weight loss, tail paralysis and hind-limb weakness. In this work, we investigated whether genistein would be effective in the treatment of EAE induced in C57Bl/6 mice. These animals were immunized with MOG₃₅₋₅₅ peptide in adjuvant, and a group was treated daily with genistein 3 days after the beginning of the clinical signs (14 dpi), when the disease was already established. Thereafter, EAE severity was recorded daily using a weight measurement and a clinical score scale. The mice showed disease signs of EAE such as weakness or paralysis of their tail and limbs as well as loss of body weight, which became apparent around days 10–12 following immunization. Subcutaneous injections of genistein were demonstrated to be effective in treating MOG₃₅₋₅₅-induced mice. From day 12 on, the daily weight means of untreated animals were remarkably different when compared to control animals ($p < 0.001$ from day 13 to 21) (Figure 1A). Thus, the treatment with this compound was revealed to be significantly more efficient at days 20 ($p < 0.05$) and 21 ($p < 0.01$), as genistein-treated and untreated groups were compared (Figure 1A). On the other hand, whilst the weight mean for the untreated mice remained

lower than for the genistein-treated mice at the last dpi, genistein-treated mice increased in weight and recovered initial weight at the endpoint (Figure 1A). Clinical evidence of disease in the genistein-treated group (first noticed at day 10) peaked at day 15 after immunization while in the untreated group it peaked at days 17 and 18 according to the clinical score assessment (Figure 1B). From day 17 on, the groups showed pronounced differences mainly at the last four time points which were statistically significant ($p < 0.05$) (Figure 1B). Limp tail and hind-limb weakness were the major clinical features noted. Paralleling the clinical signs after treatment with genistein, there was not only a dramatic weight gain but also a reduction of the clinical score in the treated group at the same time (Figure 1).



B

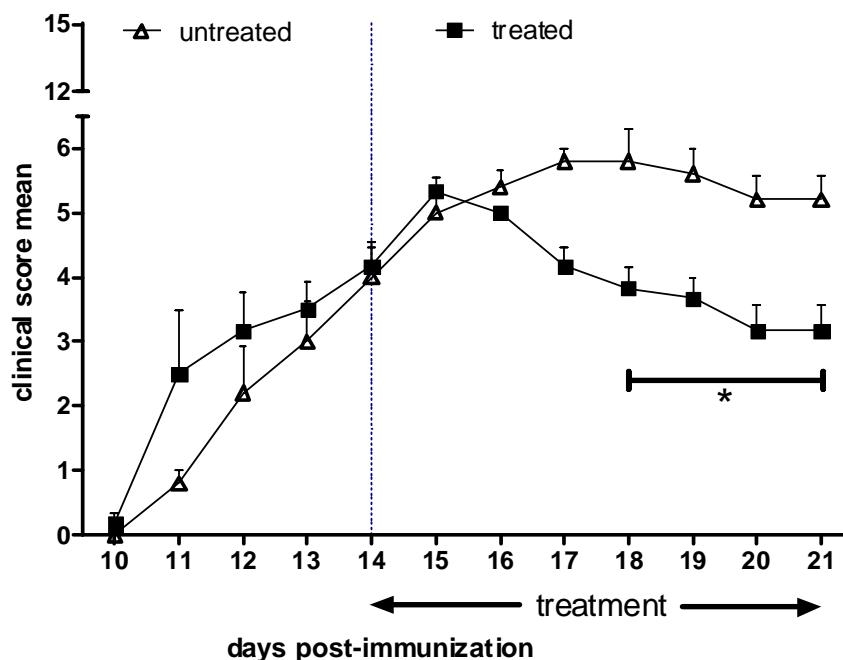


Figure 1 – Genistein ameliorates EAE clinical signs. Animals were monitored daily for clinical signs of EAE after immunization with MOG₃₅₋₅₅ peptide. Mice were treated or not with genistein during 7 days. (A) Weight measurement of EAE mice treated or not with genistein, and the control mice. (B) Clinical scores of EAE mice treated or not with genistein after 10 dpi. Each point represents the arithmetic mean \pm SEM of 3-6 mice, and results are representative of two different experiments. Dashed lines: beginning of the treatment. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

Genistein modulates EAE by up-regulating IL-10 and down-regulating inflammatory cytokines in the CNS

To determine the cytokine profile, we measured IFN- γ , TNF- α and IL-10 levels in the brain and on the splenocyte supernatants at day 21. IL-12 was also assessed in the brain. Higher levels of IFN- γ and IL-12 were observed in the untreated group than in the control group ($p < 0.05$) (Figure 2). Importantly, an impressive suppression not only of IFN- γ but also of IL-12 cytokine in the brain of the mice treated with genistein in comparison to untreated

mice ($p < 0.01$) (Figure 2). Likewise, even in relation to control mice, reduced IFN- γ levels were found in the treated mice ($p < 0.05$) (Figure 2A). Conversely, elevated IL-10 levels were noted in the brain of the genistein-treated mice when compared to untreated ($p < 0.001$) and control groups ($p < 0.05$) (Figure 2C). The TNF- α assessment in the brain revealed much lower levels in the genistein-treated mice ($p < 0.001$) compared to the untreated group (Figure 2D). Surprisingly, no significant levels of TNF- α were observed in the brain of the untreated mice in relation to control mice (Figure 2D).

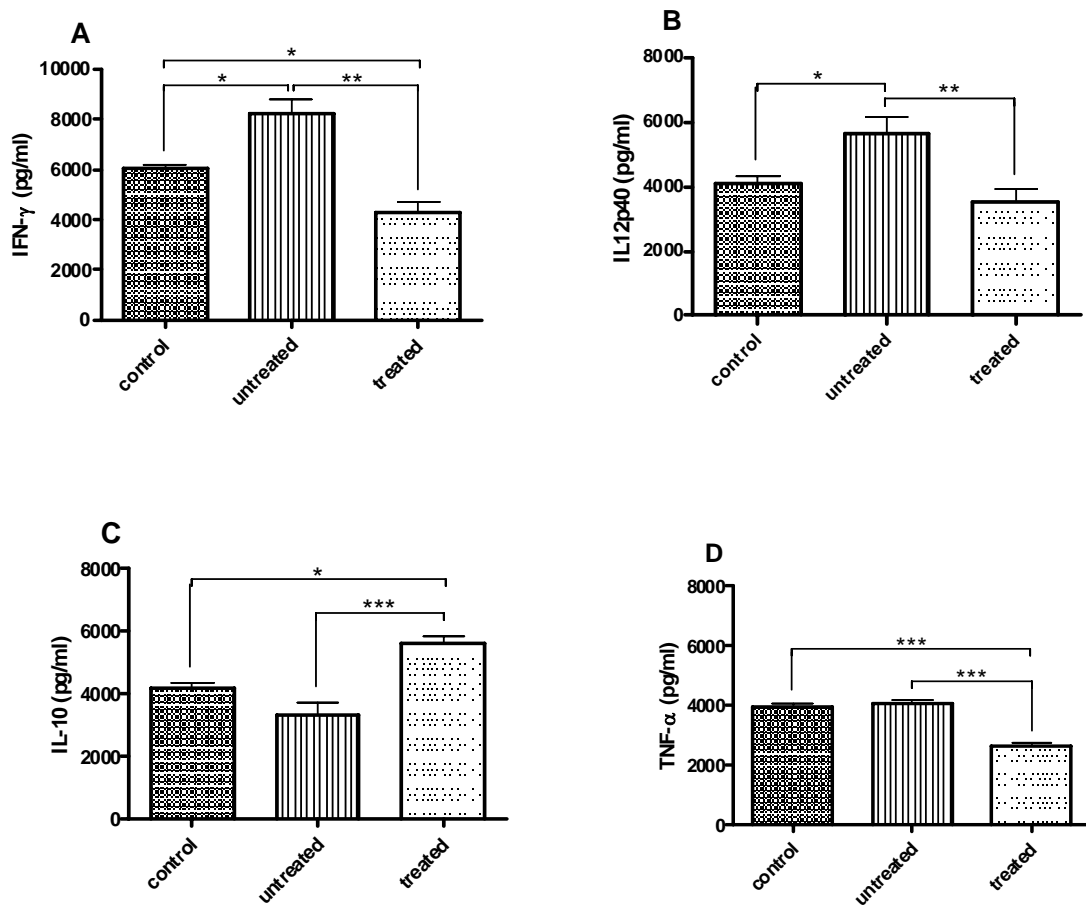
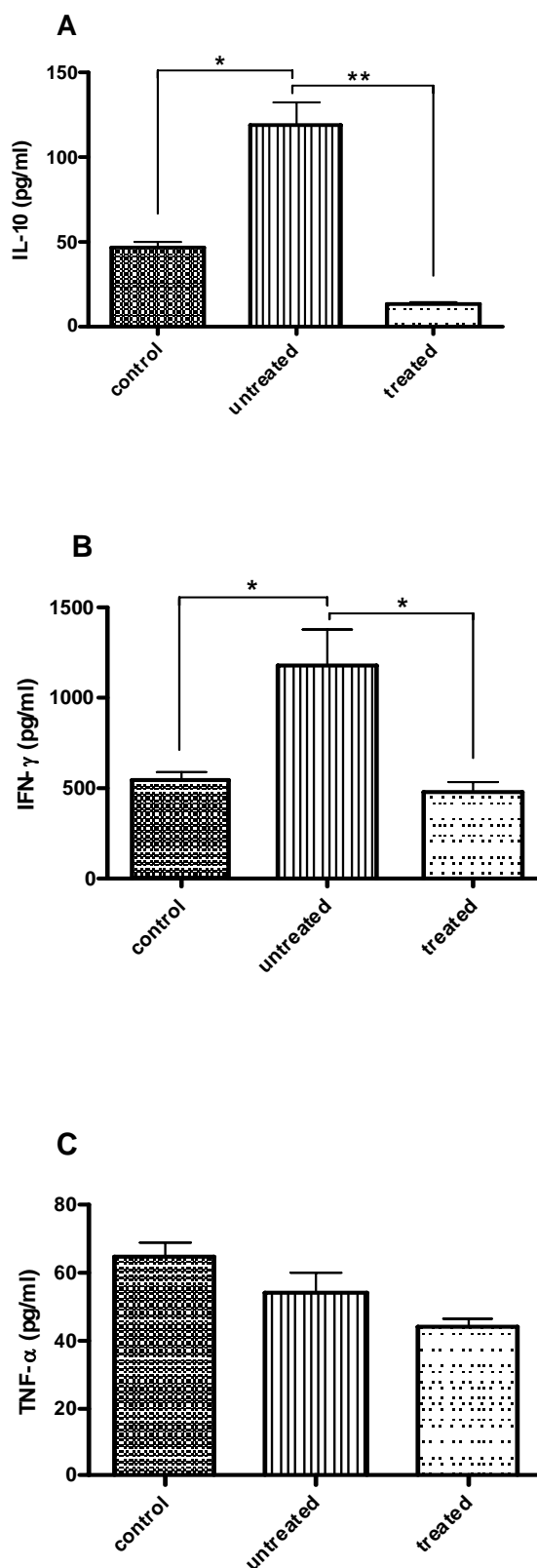


Figure 2 – Production of IFN- γ , IL-12, IL-10 and TNF- α cytokines in the brain from mice immunized with MOG₃₅₋₅₅ peptide and treated or not with genistein after 14 dpi, and the control mice. Each bar represents the arithmetic mean \pm SEM of 3-6 mice, and results are representative of two different experiments. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

Splenocytes were cultured and stimulated with specific and nonspecific antigens to assess cytokine levels on supernatants. Not only IFN- γ but also IL-10 production diminished in cultures from genistein-treated mice in response to ConA which stimulates polyclonal T cell response, as shown in Figures 3A ($p < 0.01$) and 3B ($p < 0.05$). Also, the TNF- α production was reduced in the genistein-treated group as compared to the untreated group, although with no statistical significance (Figure 3C). In response to MOG₃₅₋₅₅ peptide and genistein, no differences in regard to cytokine profile were detected *in vitro* (data not shown).

Figure 3 – Production of IL-10, IFN- γ and TNF- α cytokines by splenocytes from mice immunized with MOG₃₅₋₅₅ peptide and treated or not with genistein after 14 dpi, and the control mice. Each bar represents the arithmetic mean \pm SEM of 3-6 mice, and results are representative of duplicate cultures from two experiments. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.



Leukocyte rolling and adherence are remarkably altered by genistein treatment

The leukocyte-endothelium interactions in the pial microcirculation of EAE mice treated or not with genistein were analyzed using intravital microscopy at day 21. Firstly, assessing the number of rolling leukocytes, we found significant increased events in the untreated group in comparison to the control group ($p < 0.05$) (Figure 4A). In the genistein-treated mice, reduced rolling leukocytes were observed following EAE induction as compared to untreated mice ($p < 0.05$) (Figure 4A). Secondly, we noted an increased number of adhering leukocytes in the untreated animals in relation to the control animals ($p < 0.001$) (Figure 4B). Also, in the animals treated with genistein, there was a marked increase of these events as compared to untreated mice ($p < 0.001$) (Figure 4B).

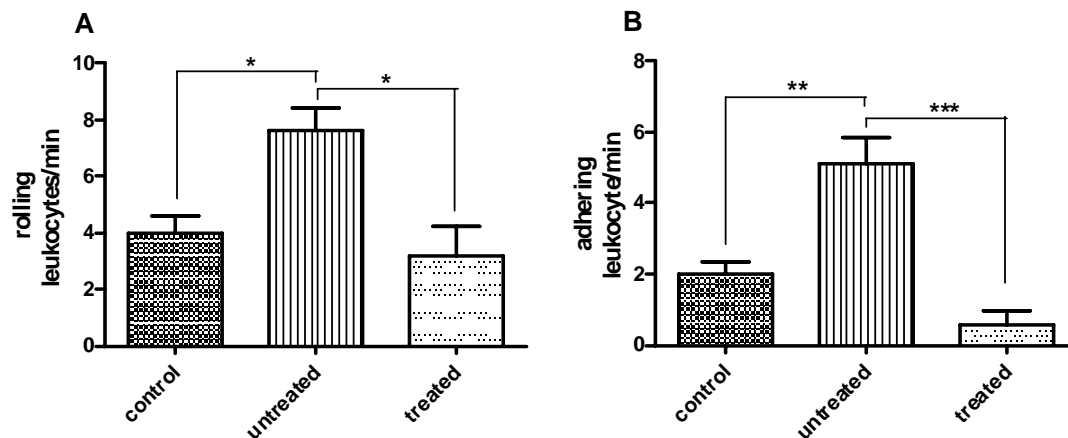


Figure 4 - Visualization of leukocyte-endothelium interaction from mice immunized with MOG₃₅₋₅₅ peptide and treated or not with genistein after 14 dpi, and the control mice. Intravital microscopy was used to assess the rolling (A) and firm adhesion (B) of leukocytes/min on brain microvasculature. Each bar represents the arithmetic mean \pm SEM of 3-4 mice, and results are representative of two independent experiments. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

Discussion

MS is still considered a CD4⁺ Th1-mediated autoimmune disease, which has socioeconomic importance second only to trauma in young adults.⁵ Although a number of immunomodulatory and immunosuppressive agents have been applied to MS treatment, better defined therapeutic strategies are required. Flavonoids and phytoestrogens have been tested in the EAE murine model, demonstrating that these compounds may have beneficial properties.^{22, 23} Due to genistein being the major bioactive isoflavone in soybeans, the biological properties of the phytoestrogens have been attributed to it. Herein, we investigated the effects of this compound on the EAE model by triggering the clinical disease in C57BL/6 mice through injection of MOG. We noted that genistein had significant beneficial effects on EAE decreasing severity not only by down-regulating inflammatory cytokines but by affecting the trafficking of leukocytes into CNS as well.

Substantial data demonstrate that genistein acts not only at the molecular level inhibiting the activity of enzymes utilizing ATP such as tyrosine-specific protein kinases but also at the cellular level inducing apoptosis and cell proliferation, suppressing osteoclast and lymphocyte functions, and exerting antioxidant effects.^{17, 24} In this context, genistein has been shown to inhibit NO generation and inducible NO synthase (iNOS) induction in cell cultures.²⁵ These characteristics therefore may be appropriate to inflammatory diseases such as MS, although we failed to show significant differences between treated and untreated groups in regard to NO overproduction in the brain (data not shown). iNOS has been found in MS lesions, suggesting a role in this pathology.²⁶ However, results from blocking iNOS in EAE are not conclusive, and additional data suggest that NO may even confer a neuroprotective effect and modulate immune responses in a beneficial way.²⁷

Animal models of autoimmune diseases are providing a valuable means of analyzing the functional roles of cytokines in the pathogenesis of autoimmunity. In our study, genistein treatment significantly lowered proinflammatory cytokine levels such as IFN- γ and IL-12 in the CNS. In addition, IFN- γ production was diminished on ConA-driven splenocytes. IFN- γ activates microglia to act as effector cells that damage CNS cells via phagocytosis and the release of cytotoxic factors including glutamate, NO, superoxide, and pro-inflammatory cytokines.^{28, 29} Conversely, IFN- γ -knockout animals develop normal EAE compared to wild-type littermates.³⁰ Despite IFN- γ possibly playing an important role in remission of MS by up-regulating pro-apoptotic proteins,³¹ the prevailing perception is that IFN- γ plays critical roles in the initiation and development of MS. IL-12, a main stimulator of IFN- γ , has long been known to drive Th1 polarization,³² and use of anti-IL-12 can ameliorate EAE.³³ Yet in the absence of IL-12R β 2, mice developed more severe clinical signs.³⁴ Other studies performed with IL-12^{-/-}, demonstrated controversial results.^{35, 36} At least in part, IL-12 has been shown to act on the disease initiation and in the CNS inflammatory events of MS.³⁷ Next, we evaluated the local TNF- α levels in brain supernatants. TNF- α production is associated with Th1 response and classically induces activation of a variety of cell types and expression of adhesion molecules, cytokines, and chemokines in the CNS, which leads to invasion by T cells and monocytes. The expression of TNF- α in the CNS parallels the disease course in EAE.⁴ In TNF- α knockout mice, invasion of the CNS by immune cells is delayed, but later develops extensively. In humans, elevated serum TNF- α concentrations and PBMC secreting TNF- α have been reported in MS patients.^{38, 39} Besides IFN- γ and IL-12, genistein dramatically reduced TNF- α levels after 7 days of treatment as compared to the untreated group. TNF- α has a direct effect on

the induction of oligodendrocyte apoptosis and demyelination.⁴⁰ Therefore, suppressed local TNF- α levels suggest a remarkable effect of genistein in MOG-induced EAE.

In the present report, we also analyzed IL-10 levels in the CNS and on cultured splenocytes supernatant. Reduced IL-10 levels on ConA-driven cultured splenocytes may be explained by different responses in distinctive cells. IL-10 has as primary function to inhibit cytokine production by macrophages such as TNF- α . It suggests that genistein may diminish TNF- α levels either directly, or indirectly by augmenting IL-10 expression. Accumulated evidence has demonstrated that IL-10 is an important cytokine in the recovery from EAE. In contrast, IL-10 was shown to play a dominant role in the regulation of EAE since IL-10^{-/-} mice suffer a severe non-remitting disease.⁴¹ Nevertheless, the consensus is that IL-10 is a more potent regulator of EAE,⁴² and a cytokine circuitry involving IL-10 and IL-12 as counter-regulators has been proposed to control disease progression.³⁵ In this context, compounds such as genistein might become useful in inflammatory disorders including MS.

A pathological hallmark of MS is the infiltration of immune cells across the endothelium of the blood brain barrier and their subsequent entry into the CNS.⁴³ Leukocyte extravasation has been separated into discrete steps, which are associated with interacting pairs of selectins and their ligands, integrins and cell-adhesion molecules, and particularly chemokines and their receptors.⁴⁴ To migrate into sites of inflammation, leukocytes must first tether and roll along the vessel before they firmly adhere and emigrate out of the microvasculature.⁴⁵ In the current work we performed intravital microscopy to evaluate the leukocyte rolling and adhesion in the brain microvasculature of EAE mice. Previous studies have demonstrated the presence of chemokines in brain lesions and CSF of

MS patients.⁴⁶⁻⁴⁸ We noted a marked alteration not only in leukocyte rolling but also in leukocyte adherence, suggesting that genistein acts indirectly on interaction between cells and endothelium in the pial microvasculature by down-regulating inflammatory cytokines as discussed above. Even though we did not evaluate the determinant molecules involved in this process such as chemokines, integrins or cell-adhesion molecules, we cannot rule out that genistein might also act directly on them especially because phytoestrogens have significantly higher affinities for estrogen receptors- β , which are located in high concentration in the brain.⁴⁹ In addition, experimental evidence reported that genistein inhibits important enzymes responsible for up-regulating adhesion proteins and integrins.^{50,51}

Taken together, our results suggest that genistein may be a potential and alternative application to immune system pathologies. Limiting the activation and subsequent migration of immune cells into the CNS appears to be an interesting approach to developing a treatment for MS.

Acknowledgments

This work was supported by grants from CAPES, CNPq and FAPEMIG. Language assistance was provided by Daniel Stockdell.

References

1. Weiner HL, Selkoe DJ. Inflammation and therapeutic vaccination in CNS diseases. *Nature* 2002; 420: 879-84.
2. Steinman L, Zamvil S. Transcriptional analysis of targets in multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 483-92.
3. Dyment D, Ebers G, Sadovnick AD. Genetics of multiple sclerosis. *The Lancet Neurology* 2004; 3: 104-10.
4. Begolka WS, Miller SD. Cytokines as intrinsic and exogenous regulators of pathogenesis in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Res Immunol* 1998; 149: 771-81.
5. Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev of Immunol* 2005; 23: 683-747.
6. Gerard C, Rollins BJ. Chemokines and disease. *Nat Immunol* 2001; 2: 108-15.
7. Offner H, Adlard K, Zamora A, Vandembark AA. Estrogen potentiates treatment with T-cell receptor protein of female mice with experimental encephalomyelitis. *J Clin Invest* 2000; 105: 1465-72.

8. Vegeto E, Belcredito S, Etteri S, Ghisletti S, Brusadelli A, Meda C et al. Estrogen receptor- α mediates the brain antiinflammatory activity of estradiol. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 9614-19.
9. Kamada M, Irahara M, Maegawa M, Ohmoto Y, Murata K, Yasui T et al. Transient increase in the levels of T-helper 1 cytokines in postmenopausal women and the effects of hormone replacement therapy. *Gynecol Obstet Invest* 2001; 52: 82-8.
10. Matejuk A, Adlard K, Zamora A, Silverman M, Vandembark AA, Offner H. 17 beta-estradiol inhibits cytokine, chemokine, and chemokine receptor mRNA expression in the central nervous system of female mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res* 2001; 65: 529-42.
11. Kuiper GGJM, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT et al. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β . *Endocrinology* 1998; 139: 4252-4263.
12. Lissin LW, Cooke JP. Phytoestrogens and cardiovascular health. *J Am Coll Cardiol*. 2000; 35: 1403-10.
13. Bhathena SJ, Velasquez MT. Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes. *Am J Clin Nutr* 2002; 76: 1191-1201.

14. Lamartiniere CA, Cotroneo MS, Fritz WA, Wang J, Mentor-Marcel R, Elgavish A. Genistein chemoprevention: timing and mechanisms of action in murine mammary and prostate. *J Nutr* 2002; 132: 552S-555S.
15. Tham DM, Gardner CD, Haskell WL. Potential health benefits of dietary phytoestrogens: a review of the clinical, epidemiological, and mechanistic evidence. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 2223-35.
16. Wei H, Bowen R, Cai Q, Barnes S, Wang Y. Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995; 208: 124-30.
17. Polkowski K, Mazurek AP. Biological properties of genistein. A review of in vitro and in vivo data. *Acta Pol Pharm.* 2000; 57: 135-55.
18. Yellayi S, Naaz A, Szewczykowski MA, Sato T, Woods JA, Chang J et al. The phytoestrogen genistein induces thymic and immune changes: A human health concern? *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 7616-21.
19. Frank S, Kolb N, Werner ER, Pfeilschifter J. Coordinated induction of inducible nitric oxide synthase and GTP-cyclohydrolase I is dependent on inflammatory cytokines and interferon-gamma in HaCaT keratinocytes: implications for the model of cutaneous wound repair. *J Invest Dermatol* 1998; 111: 1065-71.

20. Liu SF, Ye X, Malik AB. In vivo inhibition of nuclear factor-kappa B activation prevents inducible nitric oxide synthase expression and systemic hypotension in a rat model of septic shock. *J Immunol* 1997; 159: 3976-83.
21. Carvalho-Tavares J, Hickey MJ, Hutchison J, Michaud J, Sutcliffe IT, Kubes P. A role for platelets and endothelial selectins in tumor necrosis factor- α -induced leukocyte recruitment in the brain microvasculature. *Circ Res* 2000; 87: 1141-48.
22. Hendriks JJA, Alblas J, van der Pol SMA, van Tol EAF, Dijkstra CD, de Vries HE. Flavonoids influence monocytic GTPase activity and are protective in experimental allergic encephalitis. *J Exp Med* 2004; 200: 1667-72.
23. Singh NP, Hegde V, Hofseth LJ, Nagarkatti M, Nagarkatti P. Resveratrol (trans-3, 5,4'-trihydroxystilbene) ameliorates experimental allergic encephalomyelitis (EAE) primarily via induction of apoptosis in T cells involving activation of AhR and ER. *Mol Pharmacol* 2007; in press.
24. Gossner G, Choi M, Tan L, Fogoros S, Griffith KA, Kuenker M. Genistein-induced apoptosis and autophagocytosis in ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol.* 2007; 105: 23-30.
25. Feinstein DL, Galea E, Reis DJ. Suppression of glial nitric oxide synthase induction by heat shock: effects on proteolytic degradation of IkappaB-alpha. *Nitric Oxide* 1997; 1: 167-76.

26. Bö L, Dawson TM, Wesselingh S, Mörk S, Choi S, Kong PA. Induction of nitric oxide synthase in demyelinating regions of multiple sclerosis brains. *Ann Neurol* 1994; 36: 778-86.
27. Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, Rizzarelli E, Butterfield DA, Giuffrida Stella AM. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci* 2007; 8: 766-75.
28. Kempermann G, Neumann H. Microglia: The Enemy Within? *Science* 2003; 302: 1689-90.
29. Platten M, Steinman L. Multiple sclerosis: trapped in deadly glue. *Nat Med* 2005; 11: 252-53.
30. Willenborg DO, Fordham SA, Staykova MA, Ramshaw IA, Cowden WB. IFN- γ is critical to the control of murine autoimmune encephalomyelitis and regulates both in the periphery and in the target tissue: a possible role for nitric oxide. *J Immunol* 1999; 163: 5278-86.
31. Takeuchi H, Wang J, Kawanokuchi J, Mitsuma N, Mizuno T, Suzumura A. Interferon-gamma induces microglial-activation-induced cell death: a hypothetical mechanism of relapse and remission in multiple sclerosis. *Neurobiol Dis* 2006; 22: 33-9.

32. Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, Vieira P, Hsieh CS, Culpepper JA et al. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol* 1995; 154: 5071-79.
33. Leonard JP, Waldburger KE, Goldman SJ. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against interleukin 12. *J Exp Med* 1995; 181: 381-86.
34. Zhang GX, Gran B, Yu S, Li J, Siglienti I, Chen X et al. Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in IL-12 receptor- β 2-deficient mice: IL-12 responsiveness is not required in the pathogenesis of inflammatory demyelination in the central nervous system. *J Immunol* 2003; 170: 2153-60.
35. Segal BM, Dwyer BK, Shevach EM. An interleukin (IL)-10/IL-12 immunoregulatory circuit controls susceptibility to autoimmune disease. *J Exp Med* 1998; 187: 537-46.
36. Xiao BG, Ma CG, Xu LY, Link H, Lu CZ. IL-12/IFN- γ /NO axis plays critical role in development of Th1-mediated experimental autoimmune encephalomyelitis. *Mol Immunol* 2007; in press.
37. Hafler DA. Multiple sclerosis. *J Clin Invest* 2004; 113: 788-94.
38. Hohnoki K, Inoue A, Koh CS. Elevated serum levels of IFN- γ , IL-4 and TNF- α /unelevated serum levels of IL-10 in patients with demyelinating diseases during the acute stage. *J Neuroimmunol* 1998; 87: 27-32.

39. Ozenci V, Kouwenhoven M, Huang YM, Kivisakk P, Link H. Multiple sclerosis is associated with an imbalance between tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha)- and IL-10-secreting blood cells that is corrected by interferon-beta (IFN-beta) treatment. *Clinical & Experimental Immunology* 2000; 120: 147-153.
40. Probert L, Akassoglou K, Pasparakis M, Kontogeorgos G, Kollias G. Spontaneous inflammatory demyelinating disease in transgenic mice showing central nervous system-specific expression of tumor necrosis factor {alpha}. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 11294-98.
41. Bettelli E, Prabhu Das M, Howard ED, Weiner HL, Sobel RA, Kuchroo VK. IL-10 is critical in the regulation of autoimmune encephalomyelitis as demonstrated by studies of IL-10- and IL-4-deficient and transgenic mice. *J Immunol* 1998; 161: 3299-06.
42. Bettelli E, Nicholson LB, Kuchroo VK. IL-10, a key effector regulatory cytokine in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Autoimmun* 2003; 20: 265-67.
43. Adams CW, Poston RN, Buk SJ. Pathology, histochemistry and immunocytochemistry of lesions in acute multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 1989; 92: 291-306.
44. Ransohoff RM, Kivisakk P, Kidd G. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 569-81.

45. Kerfoot SM, Kubes P. Overlapping roles of P-selectin and α 4 integrin to recruit leukocytes to the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2002; 169: 1000-06.
46. Sorensen TL, Tani M, Jensen J, Pierce V, Lucchinetti C, Folcik VA et al. Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. *J Clin Invest* 1999; 103: 807-15.
47. Mahad DJ, Ransohoff RM. The role of MCP-1 (CCL2) and CCR2 in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Semin Immunol* 2003; 15: 23-32.
48. Glass WG, Hickey MJ, Hardison JL, Liu MT, Manning JE, Lane TE. 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* 2004; 172: 4018-25.
49. Kuiper GGJM, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . *Endocrinology* 1997; 138: 863-70.
50. Weber C, Negrescu E, Erl W, Pietsch A, Frankenberger M, Ziegler-Heitbrock HW et al. Inhibitors of protein tyrosine kinase suppress TNF-stimulated induction of endothelial cell adhesion molecules. *J Immunol* 1995; 155: 445-51.

51. Muller DM, Pender MP, Greer JM. Chemokines and chemokine receptors: potential therapeutic targets in multiple sclerosis. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2004; 3: 279-90.

5. ANEXO

De: msjournal@ion.ucl.ac.uk

Data: 23/10/2007 02:15:02

Para: mareguerra@click21.com.br; masouza.icb@ufjf.edu.br

Assunto: Multiple Sclerosis Journal - Manuscript ID MSJ-07-0249

23-Oct-2007

Dear Mr. De Paula:

Your manuscript entitled "Genistein down-modulates proinflammatory cytokines and reverses clinical signs of experimental autoimmune encephalomyelitis" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Multiple Sclerosis Journal.

Your manuscript ID is MSJ-07-0249.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <http://mc.manuscriptcentral.com/multiple-sclerosis> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/multiple-sclerosis>.

Thank you for submitting your manuscript to the Multiple Sclerosis Journal.

Sincerely,
Multiple Sclerosis Journal Editorial Office.