

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM IMUNOLOGIA

Adriana Karla Gávio Silva

**AVALIAÇÃO DO EFEITO IMUNOMODULADOR DO 17 β -ESTRADIOL NA
ENCEFALOMIELEITE AUTO-IMUNE EXPERIMENTAL MURINA**

JUIZ DE FORA
2010

ADRIANA KARLA GÁVIO SILVA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO IMUNOMODULADOR DO 17 β -ESTRADIOL NA
ENCEFALOMIELEITE AUTO-IMUNE EXPERIMENTAL MURINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração: Imunologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Ferreira

JUIZ DE FORA

2010

Silva, Adriana Karla Gávio.

Avaliação do Efeito Imunomodulador do 17 β -Estradiol na Encefalomielite Auto-imune Experimental Murina / Adriana Karla Gávio Silva - 2010.

60 f. il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) –
Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2010.

1. Esclerose Múltipla. 2. Encefalomielite Auto-imune Experimental. 3. 17 β -Estradiol. I. Título.

CDU 616 - 004

AGRADECIMENTOS

À DEUS, que é mantenedor de todas as coisas, pela vida, pela saúde e pela oportunidade de realização de mais este sonho.

À minha mãe, Eny, pelo grande apoio na realização deste trabalho.

À minha orientadora, Professora Ana Paula Ferreira, pela orientação dedicação e incentivo durante todo o período de desenvolvimento desta dissertação.

À Professora Jacy Gameiro do Laboratório de Imunologia, Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora pela ajuda nos últimos experimentos e na correção deste texto.

À Professora Rosa Maria Esteves Arantes do Laboratório de Neuro-Imunologia, Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais pela importante colaboração com as análises histopatológicas.

Ao Professor Rogério Estevam Farias do Setor de Histologia e Embriologia, Departamento de Morfologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora pela por ter me auxiliado com a Imunohistoquímica.

Ao Professor Henrique Couto Teixeira, Laboratório de Imunologia, Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, pelo apoio e amizade.

À Michele Mendes Barsante, que não se encontra mais entre nós, mas que deixou uma grande contribuição ao trazer o modelo de Encefalomielite Auto-imune Experimental para o nosso laboratório.

Ao amigo Márcio Luiz de Paula pelas inumeráveis dicas durante a realização deste trabalho.

Aos colegas:

Caio César de Souza Alves pela ajuda com os experimentos.

Livia Leite Alves pela participação neste projeto.

Michele Fernandes Rodrigues cuja ajuda na preparação das lâminas para histopatologia foi imprescindível

Sandra Ribeiro Bertelli de Castro por toda a ajuda que me deu.

Alessa Sin Singer Brugiolo pela ajuda nos últimos experimentos.

À todos os demais colegas do laboratório de Imunologia sempre disponíveis para toda ajuda necessária.

Às secretarias Laura Ferraz e Letícia Silva de Souza Ponzo pela colaboração nas questões burocráticas.

À funcionária Leidiana Carla da Silva sempre muito prestativa.

À FAPEMIG, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro dado a este trabalho.

A todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a realização desta pesquisa.

RESUMO

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença inflamatória, crônica e desmielinizante do sistema nervoso central (SNC). Embora ela seja, ainda, de etiologia desconhecida, é considerada uma doença auto-imune mediada por linfócitos T “helper” 1 (Th1) e T “helper” 17 (Th17) e com predominância em mulheres. Contudo, as bases para esta predominância ainda não estão bem elucidadas. Os primeiros sintomas da EM, normalmente, surgem após a maturidade sexual. Por outro lado, níveis elevados de hormônios sexuais durante o período de gravidez parecem reduzir os sinais e sintomas, os quais aumentam no período pós-parto. A Encefalomielite auto-imune experimental (EAE) é o modelo animal mais usado para estudar a EM. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do tratamento com 17 β -Estradiol na prevenção da EAE murina. Os resultados indicaram que o tratamento com este hormônio melhorou o curso clínico da doença, diminuiu a concentração de citocinas pró-inflamatórias, como interferon-gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e interleucina 17 (IL-17), e a infiltração de leucócitos no SNC, além de aumentar os níveis da interleucina 10 (IL-10). Houve, também, um aumento de linfócitos B no cérebro e baço dos animais submetidos ao tratamento. Portanto, o 17 β -Estradiol parece desempenhar um papel imunomodulador na EAE.

Palavras-chave: Esclerose Múltipla. Encefalomielite auto-imune experimental. 17 β -Estradiol.

ABSTRACT

Multiple Sclerosis (ME) is an inflammatory, chronic and demyelinating disease of the central nervous system (CNS). Although the etiology of it is still unclear, it is considered a CD4⁺ T Helper-1-mediated and CD4⁺ T Helper-17-mediated autoimmune disease and the highest prevalence of it is in women. However, the basis for this prevalence isn't still well clear. The first symptoms of ME, often, appear after sexual maturity. On the other hand, high levels of sexual hormones during pregnancy seems to low signs and symptoms, which to be high after childbirth. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is an animal model to study ME. Therefore, the aim of this study was to investigate the effects of treatment with 17 β -Estradiol on murine EAE. Results indicated that the treatment with this hormone ameliorated the clinical course of the disease, decreased pró-inflammatory cytokines levels, like interferon-gamma (IFN- γ), tumor necrosis factor alpha (TNF- α) e interleucine 17 (IL-17), and infiltration of white blood cells on CNS, further on increased interleucine 10 (IL-10) levels. There was also an increased of B cells in brain and spleen of treated animals. In conclusion, 17 β -Estradiol may play an immunomodulatory role in EAE.

Key-words: Multiple Sclerosis. Experimental autoimmune encephalomyelitis. 17 β -Estradiol.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Hipótese auto-imune da Esclerose Múltipla	14
Figura 2 - Diferenciação celular e produção de citocinas	18
Figura 3 - Protocolo de indução da EAE	27
Figura 4 - Protocolo de tratamento com o 17 β -Estradiol	28
Tabela 1 - Escala de incapacidade neurológica	29
Figura 5 - Sinais clínicos da EAE	35
Figura 6 - Cortes cerebrais corados por HE	37
Figura 7 - Cortes cerebrais marcados com anti-CD3	39
Figura 8 - Cortes cerebrais marcados com anti-CD20	40
Figura 9 - Cortes cerebrais marcados com anti-CD68	41
Figura 10 - Número relativo de CD4, CD8 e CD19 e intensidade média de fluorescência de CD28/CD3, CD152/CD3, CD80/CD3 e CD86/CD3 em esplenócitos por citometria de fluxo	43
Figura 11 - Dosagem de citocinas em sobrenadante de macerado cerebral	45
Figura 12 - Dosagem de citocinas em sobrenadante de macerado esplênico	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP	Aprotinina
APC	“Antigen-presenting Cell” - Célula Apresentadora de Antígeno
AR	Ácido retinóico
BC	Cloreto de benzetônio
CFA	“Complete Freund's Adjuvant” - Adjuvante Completo de Freund
EAE	“Experimental autoimmune encephalomyelitis” - Encefalomielite auto-imune experimental
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
EM	Esclerose Múltipla
GA	Acetato de Glatirâmer
I.p	Intraperitoneal
IFN- β	Interferon-beta
IFN- γ	Interferon-gama
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-17	Interleucina 17
IL-21	Interleucina 21
IL-22	Interleucina 22
IL-23	Interleucina 23
M	Molar
Mg	Micrograma
mM	Milimolar
MOG	“Oligodendrocyte glycoprotein” - Glicoproteína Mielodendrítica
Ng	Nanograma
PBM	“Myelin basic protein” - Proteína básica da mielina
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
Pg	Picograma

PLP	“Proteolipid protein“ - Proteína proteolípídica
pM	Picomolar
PMSF	Fluoreto de fenil metil sulfonil
RE	Receptor de estrogênio
RE α	Receptor de estrogênio alfa
RE β	Receptor de estrogênio beta
Rpm	Rotações por minuto
S.c.	Subcutâneo
SNC	Sistema Nervoso Central
TGF- β	Fator transformador de crescimento-beta
Th1	Linfócito T CD4+ com perfil T “helper” 1
Th17	Linfócito T CD4+ com perfil T “helper” 17
Th2	Linfócito T CD4+ com perfil T “helper” 2
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
Treg	Linfócito T regulador

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 ESCLEROSE MÚLTIPLA	13
1.2 ENCEFALOMIELEITE AUTO-IMUNE EXPERIMENTAL (EAE)	16
1.3 TRATAMENTO DA ESCLEROSE MÚLTIPLA (EM)	21
2 OBJETIVOS	25
2.1 OBJETIVO GERAL	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3 MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 ANIMAIS	26
3.2 TRATAMENTO ANTI-HELMÍNTICO	26
3.3 INDUÇÃO DA EAE	27
3.4 TRATAMENTO COM 17 B-ESTRADIOL	27
3.5 AVALIAÇÃO DO CURSO CLÍNICO DA EAE	29
3.6 PREPARAÇÃO DOS CORTES E COLORAÇÃO POR HE PARA AVALIAÇÃO DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO CEREBRAL	30
3.7 MARCAÇÃO DE LINFÓCITOS T, B E MACRÓFAGOS PARA AVALIAÇÃO POR IMUNOHISTOQUÍMICA	30
3.8 PREPARAÇÃO DE CÉLULAS ESPLÊNICAS PARA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MARCADORES POR CITOMERTRIA DE FLUXO	31
3.9 DOSAGEM DE CITOCINAS EM SOBRENADANTE DE MACERADO CEREBRAL E ESPLÊNICO	32
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
4 RESULTADOS	34
4.1 AVALIAÇÃO DO CURSO CLÍNICO DA EAE	34
4.2 AVALIAÇÃO DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO CEREBRAL POR HE	36
4.3 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MARCADORES DE LINFÓCITOS T, B E MACRÓFAGOS POR IMUNOHISTOQUÍMICA	38
4.4 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MARCADORES EM CÉLULAS ESPLÊNICAS POR CITOMETRIA DE FLUXO	42
4.5 DOSAGEM DE CITOCINAS EM SOBRENADANTE DE MACERADO	

CEREBRAL E ESPLÊNICO	44
5 DISCUSSÃO	47
6 CONCLUSÃO	53
7 REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO

1.1 ESCLEROSE MÚLTIPLA

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença inflamatória, crônica e desmielinizante do sistema nervoso central (SNC) com uma etiologia ainda desconhecida. Ela afeta mais de um milhão de pessoas em todo o mundo, sendo mais comum em mulheres brancas (NOONAN *et al.*, 2010).

Atualmente existem duas hipóteses para a etiologia da EM: A hipótese infecciosa viral e a hipótese auto-imune. Elas são complementares uma vez que estudos utilizando modelos animais mostraram degeneração axonal em ambas, sendo esta degeneração o determinante principal da incapacidade neurológica irreversível em pacientes com EM (revisto por GRIGORIADIS; HADJIGEORGIOU, 2006).

De acordo com a hipótese infecciosa viral, muitos vírus, como o vírus da encefalomielite murina de Theiler (TMEV) e o vírus da hepatite murina (MHV-4), são capazes de induzir a desmielinização em animais de laboratório. Após a infecção, os vírus ativam as células apresentadoras de antígenos (APCs). Estes vírus contêm seqüências protéicas similares às seqüências dos antígenos da mielina (mimetismo molecular) e, em hospedeiros susceptíveis, ocorre reação cruzada, ou seja, respostas imunológicas ao microorganismo resultam em reações contra os próprios tecidos. A infecção viral sobre um tecido-alvo pode, também, causar a destruição do tecido e liberação de auto-antígenos seqüestrados (ativação “bystander”). Desta forma, linfócitos específicos para estes auto-antígenos seqüestrados são recrutados para a área lesada. Auto-antígenos seqüestrados são aqueles que não foram apresentados aos linfócitos imaturos no timo e na medula óssea e, portanto, não são reconhecidos como próprios pelos linfócitos maduros nos tecidos periféricos. Quando um tecido-alvo é lesado, possivelmente, mais de um auto-antígeno seqüestrado está envolvido na reação imune (disseminação de epítomos). Assim, uma reação auto-imune inicialmente direcionada contra um único auto-antígeno

seqüestrado pode se espalhar para outros (revisto por GRIGORIADIS; HADJIGEORGIU, 2006).

Na hipótese auto-imune, ao contrário da hipótese infecciosa viral, a causa da ativação dos linfócitos é desconhecida. Possivelmente, esta causa seja a perda da tolerância central e/ou periférica em função de reação cruzada com gatilhos exógenos em pessoas geneticamente susceptíveis. O processo de desmielização inicia-se com a ativação de linfócitos T periféricos com reatividade à mielina que atravessam a barreira hematoencefálica em direção ao SNC auxiliados por um aumento na expressão de citocinas inflamatórias, moléculas de adesão e receptores de quimiocinas nas células endoteliais desta barreira. Os auto-antígenos da mielina, sobretudo a Proteína Básica da Mielina (PBM) e a Glicoproteína Mielodendrítica (MOG) são apresentados por astrócitos e células gliais a estes linfócitos T auto-reativos desencadeando uma cascata que libera mediadores inflamatórios e culmina com a lesão ou, mesmo, destruição da bainha de mielina (Fig.1) (revisto por NEUHAUS *et al.*, 2006).

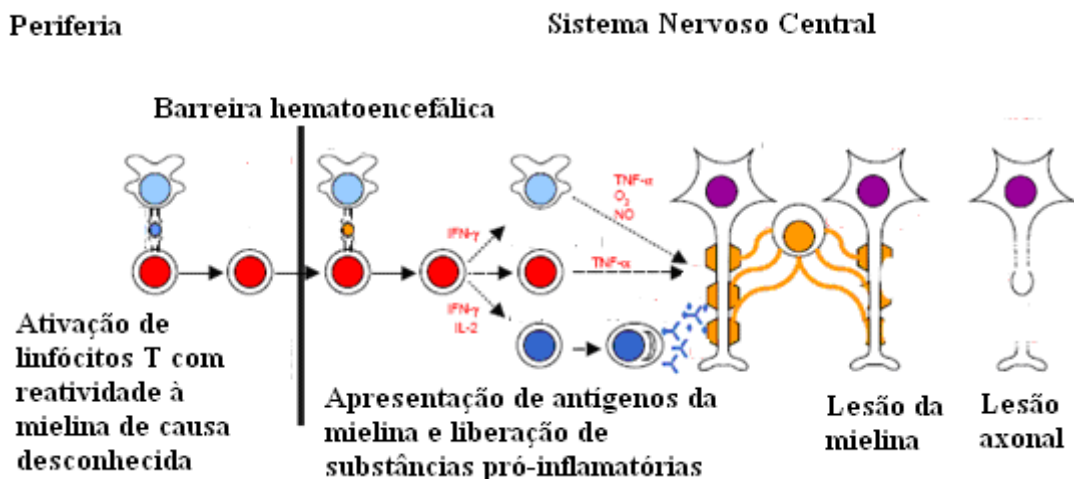


Figura 1 - Hipótese auto-imune da Esclerose múltipla
Fonte - Revisto por NEUHAUS *et al.*, 2006 modificada

A EM se desenvolve em pessoas geneticamente susceptíveis, entretanto, são necessários gatilhos ambientais. Similar a outras doenças auto-imunes mediadas

por linfócitos T, os genes que conferem risco específico para EM são o HLA-DQ e o HLA-DR (LINCOLN *et al.*, 2009).

O quadro clínico da EM na maioria dos pacientes inicia-se com surtos que se alternam com remissões. Considera-se surto a ocorrência de sintomas de disfunção neurológica com mais de 24 horas de duração na ausência de febre ou infecção (revisto por TILBERY *et al.*, 2000).

As formas clínicas para a EM são: (1) Esclerose Múltipla Recorrente-Remitente (EMRR), na qual ocorrem surtos claramente definidos com recuperação completa ou com seqüelas após a recuperação e períodos entre os surtos caracterizados por ausência de progressão da doença; (2) Esclerose Múltipla Secundária Progressiva (EMSP) que sempre começa como Esclerose Múltipla Recorrente-Remitente e evolui para uma doença progressiva, com ou sem surtos, pequenas remissões e platôs; (3) Esclerose Múltipla Primária Progressiva (EMPP) que apresenta progressão da doença desde o início com platôs ocasionais e pequenas melhoras temporárias. Os pacientes apresentam uma piora contínua e gradual da sua condição sem surtos claros; (4) Esclerose Múltipla Progressiva Recorrente (EMPR) em que ocorre progressão da doença desde o início com claros surtos agudos, com ou sem recuperação completa e com progressão contínua entre os surtos (revisto por LUBLIN, 2007 APUD LUBLIN; REINGOLD, 1996).

Os sintomas mais comuns da EM são fraqueza muscular, alterações da sensibilidade, deficiências visuais e/ou auditivas, alterações na coordenação motora e no controle dos movimentos finos, entre outros (Castro 1999).

1.2 ENCEFALOMIELEITE AUTO-IMUNE EXPERIMENTAL (EAE)

A encefalomielite auto-imune experimental (EAE) é o modelo mais utilizado para o estudo da EM. Algumas razões contribuem para a utilização deste modelo de auto-imunidade antígeno-induzida: (1) Pode ser facilmente induzido em muitas linhagens de camundongos singênicos como a SJL/J, a PL/J e a C57Bl/6; (2) As manifestações clínicas, como paralisia e perda do tônus da cauda (em roedores), são perceptíveis para a maioria dos pesquisadores (YANG, 2003).

A EAE se caracteriza tanto pela inflamação mediada por células mononucleares (monócitos e macrófagos) quanto por desmielinização, características que se assemelham às da EM. O modelo murino C57Bl/6 tem sido bastante útil na indução da EAE crônica, severa e sem recaídas, especialmente quando se utiliza o peptídeo MOG como indutor da doença (YANG, 2003).

Este modelo pode ser induzido através de componentes da PBM, da MOG ou do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, ou, ainda, da Proteína Proteolipídica (PLP) em adjuvante completo de Freund (CFA). A EAE pode, também, ser induzida através da transferência adotiva de linfócitos T CD4⁺, auto-reativos, de animais imunizados para animais “naive”, os quais desenvolvem a doença (LEADBETTER *et al.*, 1998).

As citocinas desempenham um importante papel na inflamação e nas respostas auto-imunes. Citocinas são proteínas ou glicoproteínas que atuam como mensageiros moleculares. Os linfócitos T CD4⁺ podem se desenvolver em linfócitos T “helper” 1 (Th1) ou T “helper” 2 (Th2), os quais são caracterizados por suas habilidades em produzir diferentes citocinas. Os linfócitos Th1 produzem, preferencialmente, interleucina 2 (IL-2), interferon-gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), enquanto que os linfócitos Th2 produzem, entre outras citocinas, a interleucina 4 (IL-4), a interleucina 5 (IL-5) e a interleucina 10 (IL-10). Estes dois grupos de citocinas frequentemente são antagonistas em seus efeitos (YANG, 2003).

A identificação dos diferentes tipos de linfócitos se deu a partir da descoberta de que estas células expressam proteínas de membrana distintas. Estas proteínas servem como marcadores fenotípicos de diferentes tipos linfocitários e são denominadas de CD + um número. CD é a abreviatura da expressão “cluster of

differentiation”, ou seja, grupo de diferenciação. Os linfócitos T “helper” expressam uma proteína de superfície chamada CD4, os linfócitos T citotóxicos (CTL) expressam o marcador CD8 e os linfócitos T reguladores (Treg) são caracterizados pela expressão das moléculas CD4 e CD25. (revisto por ZHOU *et al*, 2009).

O desenvolvimento dos linfócitos T “helper” não é um processo aleatório e sim um processo regulado pelos estímulos que os linfócitos T CD4⁺ “naive” recebem quando encontram antígenos provenientes de patógenos. Os macrófagos e as células dendríticas respondem a muitas bactérias intracelulares e vírus com a produção de interleucina 12 (IL-12). Quando os linfócitos T CD4⁺ “naive” reconhecem os antígenos dos patógenos que estão sendo apresentados por estas APCs, são expostos a IL-12 que promove a sua diferenciação para a sub-população Th1 através da ativação dos fatores de transcrição T-bet e STAT4. Se o patógeno não estimular as APCs a produzir IL-12, como talvez façam os helmintos, possivelmente os próprios linfócitos T produzirão a IL-4 que induz a diferenciação deles próprios para a sub-população Th2 através da ativação dos fatores de transcrição GATA3 e STAT5. Recentemente, foi observado que os linfócitos T CD4⁺ “naive” podem se diferenciar em outras duas populações celulares: linfócitos T “helper” 17 (Th17) e linfócitos Treg. A diferenciação para linfócitos Th17 ocorre quando linfócitos T CD4⁺ “naive” são estimulados pela interleucina 6 (IL-6) e pelo fator transformador de crescimento-beta (TGF- β), citocinas que ativam os fatores de transcrição ROR γ t e STAT3. Por outro lado, a diferenciação para linfócitos Treg ocorre quando linfócitos T CD4⁺ “naive” são estimulados pelas citocinas TGF- β e IL-2 na presença de ácido retinóico (AR), ocorrendo ativação dos fatores de transcrição FoxP3 e STAT5 (Fig. 2) (revisto por ZHOU *et al*, 2009).

Os linfócitos Th17 produzem a citocina IL-17 que desencadeia respostas inflamatórias crônicas e não compartilha elementos nem com as respostas Th1 nem com as respostas Th2. Portanto, os linfócitos Th17 são um subconjunto de células T independente de Th1 e de Th2 (KLEINSCHEK *et al.*, 2007). Por outro lado, os linfócitos Treg são subpopulações de células T CD4 com funções anti-inflamatórias e antiproliferativas, além de produzirem as citocinas TGF- β e IL-10 (Fig. 2) (KOHM *et al.*, 2002).

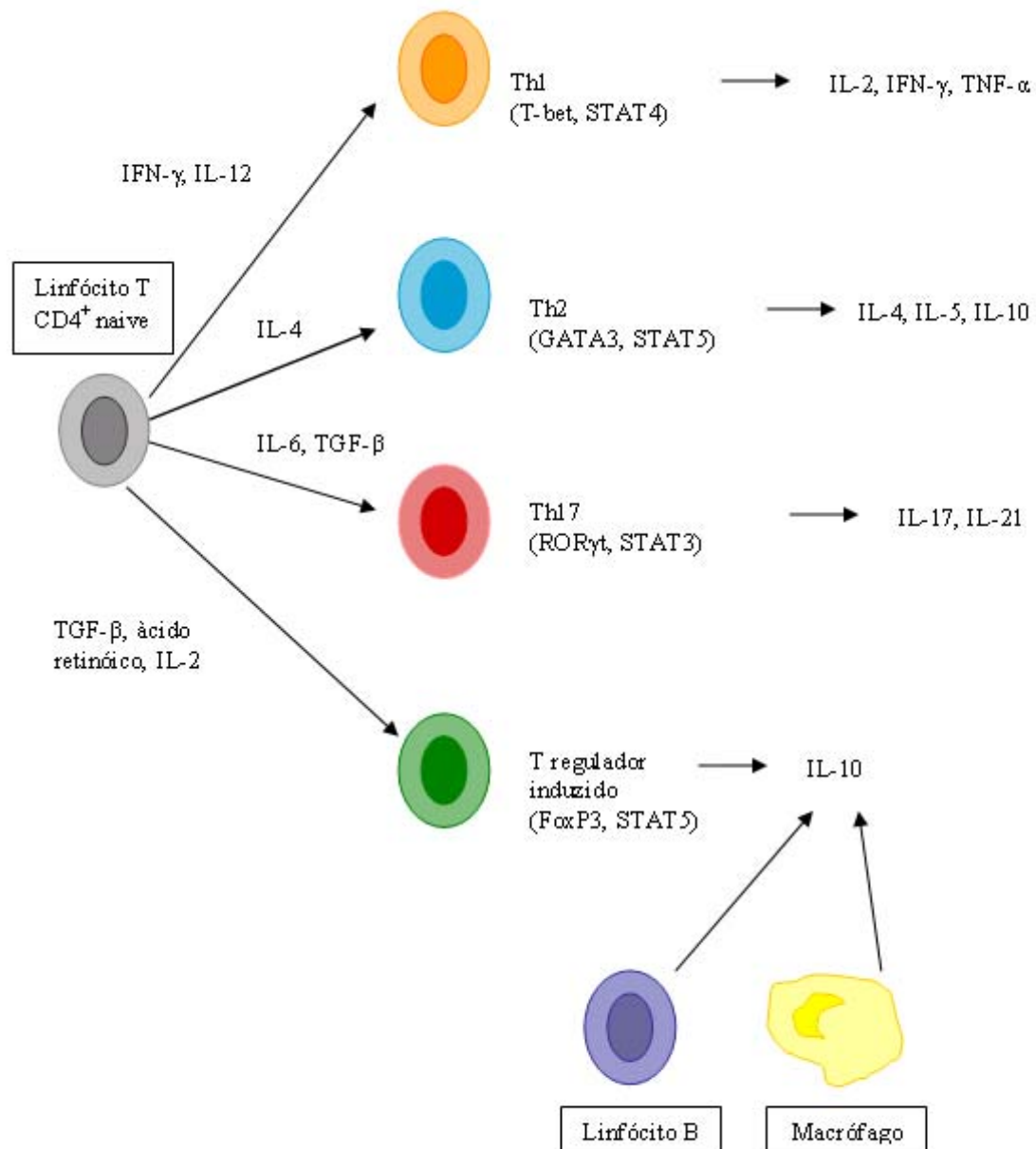


Figura 2 - Diferenciação celular e produção de citocinas
 Fonte - Revisto por ZHOU et al., 2009 modificada

Tanto a EAE quanto a EM são mediadas por linfócitos Th1 e Th17 específicos para a mielina e suas respectivas citocinas, IFN- γ e IL-17, porém a contribuição relativa de cada uma ainda não está claramente definida (MILJKOVIC *et al.*, 2009).

Linfócitos Th1 e “natural killer” (NK) são caracterizados pela produção de IFN- γ , citocina envolvida na ativação de macrófagos e na diferenciação de células T

CD4⁺ “naive” em células Th1 (BALABANOV *et al.*, 2007). Em função disto, o IFN- γ regula a função dos linfócitos T, desempenhando, assim, um papel importante nas doenças auto-imunes (revisto por CHEN e LIU, 2009).

A IL-17, produzida pelos linfócitos Th17, promove respostas inflamatórias através da indução de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e fator estimulante de colônias granulócitos e macrófagos (GM-CSF), produção de peptídeos antimicrobianos (defensinas) e de quimiocinas como CXCL1, CXCL5, CCL2 e CCL7 e indução da síntese de óxido nítrico (NO) (revisto por IWAKURA *et al.*, 2008). Em função destas características, esta citocina está, também, envolvida na patogênese de muitas doenças auto-imunes como a EAE (MARKOVIC *et al.*, 2009) e a EM (KOMIYAMA *et al.*, 2006).

Uma outra citocina importante no desenvolvimento das doenças auto-imunes é TNF- α . O TNF é uma citocina envolvida na manutenção da homeostase do sistema imunológico e, também, na patogênese das doenças auto-imunes entre elas a EAE (revisto por ZHOU *et al.*, 2002). O tratamento de ratos Lewis com anticorpos anti-TNF- α inibiu o desenvolvimento da EAE induzida através de imunização com medula espinhal de cobaia (ISSAZADEH *et al.*, 1995).

Os linfócitos B, caracterizados pelos marcadores CD19 e CD20, ao produzirem auto-anticorpos, também, podem ter uma participação importante em algumas doenças auto-imunes, podendo contribuir para o desenvolvimento da EAE. Porém, Wolf e colaboradores (1996), ao examinarem o papel dos linfócitos B na indução da EAE, usando camundongos deficientes para estes linfócitos, não observaram diferença no início ou na gravidade da doença. Por outro lado, houve dificuldade de recuperação dos sintomas clínicos destes camundongos deficientes em comparação aos animais do grupo controle. Isto sugere que além dos linfócitos B não desempenharem um papel no desenvolvimento da EAE, eles ainda podem contribuir para a sua modulação.

Embora ainda tenham um papel pouco esclarecido, parece que linfócitos B reguladores, denominados linfócitos B10 e caracterizados pela expressão de CD1d e CD5, produzam grande quantidade de IL-10 controlando a EAE em modelo murino. (YANABA *et al.*, 2008). Além disso, foi demonstrado que camundongos deficientes na expressão de CD19, apresentaram maior gravidade da EAE em comparação com os controles selvagens (MATSUSHITA *et al.*, 2006).

Existem, também, evidências sugerindo a participação dos linfócitos T CD8⁺ na EM como células efetoras. Segundo a revisão de Ji e Goverman (2007), os linfócitos T CD8⁺ excedem em quase dez vezes os linfócitos T CD4⁺ nos tecidos cerebrais de pacientes com EM e foram encontrados intimamente associados a axônios desmielinizados. Assim, para avaliar a participação dos linfócitos T CD8⁺ na EAE, Huseby e colaboradores (2001) geraram uma população linfocitária CD8⁺ específica para a PBM usando técnicas de Engenharia Genética. Foi feita, então, a transferência adotiva das células geradas para camundongos “naive” que desenvolveram uma EAE com graves sinais neurológicos e significativa perda de peso. Foram apresentados sinais, como ataxia, espasticidade, hiperreflexia e perda de coordenação motora, os quais se assemelham a muitas características da EM e não são vistos nos modelos de EAE estimulados por células T CD4⁺.

1.3 TRATAMENTO DA ESCLEROSE MÚLTIPLA (EM)

Até o início da década de 90 poucos recursos terapêuticos estavam à disposição para o tratamento de pacientes com EM. A introdução de imunomoduladores como medicamentos eficazes a partir de 1993, e posteriormente, a perspectiva do advento de um número de outras medidas terapêuticas, geraram euforia e entusiasmo a pacientes e médicos. Os imunomoduladores são eficazes para o tratamento da EMRR, porém, são parcialmente eficazes nas formas progressivas secundárias e ineficazes nas formas primárias progressivas. Os imunomoduladores atualmente utilizados são: o interferon-beta 1-a (REBIF e AVONEX), o interferon-beta 1-b (BETAFERON), (RIO *et al.*, 2005) e o acetato de glatirâmer (COPAXONE) (KARUSSIS *et al.*, 2010).

Tanto o IFN- β 1-a quanto o IFN- β 1-b parecem ter efeitos imunomodulatórios e antiproliferativos com ação inibidora do crescimento celular. Na EM eles atenuam os efeitos do IFN- γ , do TNF- α e da IL-12, inibem a ativação de monócitos, reduzem a apresentação de antígenos aos linfócitos T e aumentam citocinas como o TGF- β e a IL-10. Além disso, parece que eles impedem o rompimento da barreira hematoencefálica reduzindo, assim, a entrada dos linfócitos T auto-reativos no SNC (ROTHUIZEN *et al.*, 1999).

Os efeitos colaterais associados à terapia com IFN- β são sintomas semelhantes aos de gripe, reações (e até necrose) no local da injeção, depressão, idéias suicidas e, também, o desenvolvimento de anticorpos contra o medicamento, diminuindo, assim, a sua eficácia (revisto por VIRLEY, 2005).

O acetato de glatirâmer (GA) é constituído por uma mistura de polipeptídeos sintéticos compostos por quatro aminoácidos (alanina, glutamina, lisina e tirosina). É, estruturalmente, similar à PBM, porém não causa encefalite. Alguns trabalhos investigavam o papel encefalitogênico potencial do GA em modelos animais, mas, inesperadamente, ele suprimiu sinais clínicos agudos e crônicos da EAE em várias espécies animais. Apresenta atividade biológica na EMRR competindo com a PBM pela ação das APCs. Embora o GA seja bem tolerado, a administração pela via subcutânea induz reações no local da injeção. Entretanto, dentre os tratamentos disponíveis, é o que induz menos efeitos colaterais (KARUSSIS *et al.*, 2010).

O tratamento com corticóides também é amplamente utilizado na EM para acelerar a recuperação pós-surto, sendo a metilprednisolona por via intravenosa o corticóide mais prescrito. Embora terapias a curto prazo apresentem benefícios, as terapias à longo prazo são mais utilizadas no tratamento da EMRR, apesar delas poderem causar diminuição da densidade óssea e infecções (revisto por VIRLEY, 2005). A diminuição da densidade óssea ocorre porque os corticóides diminuem os precursores dos osteoblastos e estimulam a apoptose destas células, quando maduras (JIA *et al.*, 2006). As infecções se devem ao efeito imunossupressor dos corticóides os quais inibem a transcrição de muitos genes das citocinas pró-inflamatórias (BARNES, 2006).

As mulheres apresentam maior incidência de EM do que os homens, sendo a proporção de duas mulheres para cada homem. Porém, os homens desenvolvem uma doença mais grave (GIATTI *et al.*, 2010). Além disso, segundo a revisão de Gold e Voskuhl (2009), a EM é mais comum em mulheres jovens, porém os homens desenvolvem a doença em idade mais avançada, época que coincide com a diminuição dos níveis de testosterona, sugerindo um papel protetor para a testosterona nesta doença.

Dalal e colaboradores (1997) avaliaram os mecanismos envolvidos na diferente susceptibilidade entre os gêneros à EM. Foi usado um modelo de EAE induzido por PBM em camundongos machos e fêmeas. Neste trabalho, os linfócitos T obtidos no baço dos camundongos machos, durante a fase efetora da doença, produziram níveis mais altos de IL-10 do que aqueles obtidos no baço dos camundongos fêmeas. Foram, então, implantados “pellets” de dihydrotestosterone nas fêmeas e foi observado um curso menos grave da doença em comparação com as fêmeas tratadas com placebo, indicando que a testosterona exerce um efeito protetor na EAE.

Além disso, o efeito protetor do tratamento com estrogênios, na EAE, foi demonstrado em linhagens de camundongos como SJL/J, B10.PL e C57BL/6 (BEBO JUNIOR *et al.*, 2001 POLANCZYK *et al.*, 2003).

Assim, fica evidente a influência dos hormônios sexuais na EM, porém as bases para a predominância desta doença nas mulheres, ainda, não estão elucidadas. Os primeiros sintomas da EM normalmente surgem após a maturidade sexual. Por outro lado, níveis elevados de hormônios sexuais durante o período de

gravidez parecem reduzir os sinais e sintomas desta doença os quais aumentam no período pós-parto (BEBO JUNIOR *et al.*, 2002 APUD BIRK *et al.*, 1990).

Desta forma, existe a hipótese de que em baixas doses os estrogênios causam aumento das respostas Th1 e, portanto, susceptibilidade às doenças auto-imunes mediadas por células, enquanto que, em altas doses eles estimulam as respostas Th2, as quais protegem contra estas doenças. Isto explicaria tanto a maior incidência de doenças auto-imunes com o envolvimento de linfócitos Th1 em mulheres, quanto a diminuição destas doenças durante a gravidez (BEBO JUNIOR *et al.*, 2002).

Os estrogênios regulam o metabolismo celular em vários tecidos como os pulmões e o SNC. Além disso, os níveis extremamente baixos de estrogênios na menopausa são associados com osteoporose e doenças cardiovasculares, sugerindo que eles desempenham um papel importante não só no desenvolvimento e na diferenciação das características sexuais secundárias e na reprodução, como também, no metabolismo celular. (revisto por KORACH, 1994). Estas ações ocorrem através da interação dos hormônios com sua respectiva proteína receptora, ou seja, o receptor de estrogênio (RE) (revisto por CARSON-JURICA, 1990).

O sistema hormonal feminino é formado por três hierarquias de hormônios. Em primeiro lugar ocorre a secreção do hormônio de liberação das gonadotrofinas (GnRH). O GnRH induz a secreção do hormônio folículo-estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH). O FSH e o LH, por sua vez, estimulam os hormônios ovarianos: progestinas e estrogênios (revisto por MOENTER *et al.*, 2010).

A proteína receptora para os estrogênios apresenta duas isoformas que foram encontradas e caracterizadas em várias espécies e denominadas receptor estrogênico alfa ($RE\alpha$) e receptor estrogênico beta ($RE\beta$) (OGAWA *et al.*, 1998). Estes receptores estão presentes nas células que compõem o sistema imunológico e em vários tecidos, entre eles o SNC (GUSTAFSSON, 1999).

O papel dos receptores alfa e beta na mediação da EAE foi estudado em modelos de animais deficientes em $RE\alpha$ ou $RE\beta$. Os camundongos deficientes em $RE\alpha$ e tratados com 17 β -Estradiol desenvolveram sinais clínicos agudos, graves, de EAE e lesões histopatológicas na medula espinhal, mesmo na presença de níveis moderadamente altos de 17 β -Estradiol no soro. Em camundongos selvagens e deficientes em $RE\beta$, o tratamento com 17 β -Estradiol resultou em supressão dos sinais clínicos da EAE e ausência de lesões inflamatórias no SNC. Isto demonstra

que o efeito protetor deste hormônio ocorre via RE α e independe de RE β (POLANCZYK *et al.*, 2003).

Os fármacos utilizados para o tratamento da EM como Interferon- β , Acetato de glatirâmer e a Mitoxantrona conferem, principalmente, efeitos antiinflamatórios. Por outro lado, os estrogênios apresentam efeitos antiinflamatórios e, também, neuroprotetores (DU *et al.*, 2010) porque são lipofílicos, atravessando prontamente a barreira hematoencefálica. Isto sugere um potencial terapêutico para os estrogênios no tratamento da EM.

Um trabalho realizado pelo nosso grupo demonstrou que a genisteína, um fitoestrógeno obtido da soja, melhora os sintomas clínicos da EAE diminuindo as citocinas inflamatórias IFN- γ , TNF- α e IL-12 e aumentando a citocina reguladora IL-10. Além disso, o tratamento com genisteína diminuiu a migração de células através da barreira hematoencefálica (DE PAULA *et al.*, 2008)

Portanto, o presente trabalho teve como objetivo estudar o efeito do tratamento com 17 β -Estradiol, antes e nos dias iniciais de indução da EAE, nos sintomas clínicos desta doença e, também, em alguns parâmetros imunológicos como expressão de marcadores celulares e expressão de citocinas, colaborando, assim, para um melhor conhecimento dos mecanismos imunopatológicos envolvidos tanto na EAE quanto na EM.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os mecanismos imunomoduladores do 17 β -Estradiol em modelo murino de EAE.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Observar parâmetros clínicos como peso e pontuação clínica obtida em uma escala de incapacidade neurológica;
- Avaliar alterações histopatológicas no cérebro dos animais através de coloração por Hematoxilina-Eosina (HE);
- Avaliar a presença de linfócitos T, B e macrófagos no infiltrado inflamatório celular no cérebro dos animais através de imunohistoquímica;
- Analisar a expressão de marcadores celulares (CD4, CD8, CD19, CD28/CD3, CD152/CD3, CD80/CD11 e CD86/CD11) pelas células esplênicas por citometria de fluxo;
- Quantificar os níveis de citocinas (IFN- γ , TNF- α , IL-17, TGF- β , IL-6 e IL-10) no cérebro (resposta à EAE no órgão alvo) e no baço (resposta à EAE no órgão linfóide secundário) dos camundongos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados para a indução do modelo, camundongos da linhagem C57Bl/6, fêmeas, com 10-12 semanas, provenientes do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). Eles foram mantidos na sala de manutenção de animais do laboratório de Imunologia, em estantes ventiladas, à temperatura ambiente e dieta e água *ad libitum*. Todos os procedimentos foram realizados 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 (Protocolo Nº. 045/2005 CEA).

3.2 TRATAMENTO ANTI-HELMÍNTICO

Antes da indução do modelo de EAE, quando os camundongos estavam com 4-6 semanas de idade, foi realizado tratamento anti-helmíntico nestes animais com Ivermectina 1% (Laboratórios Bovifarm, Aracaju, CE, Brasil) e Praziquantel 150 mg (Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ, USA). Foi adicionado 800 µl de Ivermectina 1% em 1 litro de água, a qual foi dada aos animais durante 10 dias. A água com Ivermectina 1% era trocada 3 vezes por semana. Após este tratamento, os animais ficaram em repouso por 10 dias e, então, foi administrado o Praziquantel 150 mg por gavagem, utilizando-se sonda uretral infantil nº 4 (Embramed Ind. e Com., São Paulo, SP, Brasil). O comprimido de 150 mg de Praziquantel foi dissolvido em 20 ml de água filtrada. Cada camundongo recebeu 200 µl desta solução em dose única.

3.3 INDUÇÃO DA EAE

Os animais com 10-12 semanas de idade foram imunizados por via subcutânea em ambos os lados da base da cauda com 100 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ (Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, EUA) e adjuvante completo de Freund (Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, EUA) suplementado com 400 µg de *Mycobacterium tuberculosis* (H37RA; Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA). No dia da imunização e após 48 horas, foram injetados intraperitonealmente (i.p.) 300 ng de toxina pertussis (Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, EUA) (Fig. 3). Os animais imunizados foram sub-divididos randomicamente em dois grupos, dos quais um foi submetido ao tratamento com 17 β-Estradiol.

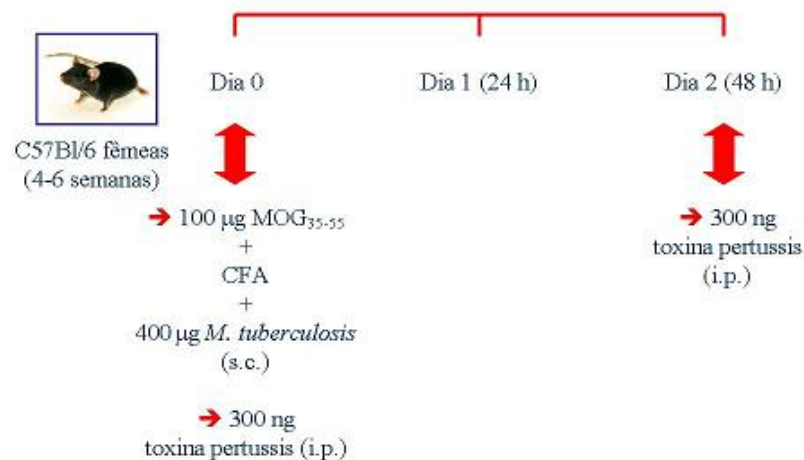


Figura 3 - Protocolo de indução da EAE.
Fonte - A autora

3.4 TRATAMENTO COM 17 β-ESTRADIOL

Os camundongos foram divididos em 3 grupos: (a) controle (não-induzido e não-tratado); (b) EAE (induzido e não-tratado); (c) EAE tratado (induzido e tratado).

Cada grupo era constituído por 6 animais. Para o tratamento, 24 µg de benzoato de 17 β-Estradiol (Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, EUA) foi diluído em 0,3 ml de álcool etílico (Quimibrás Ind. Química, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e 2,7 ml de propilenoglicol (Quimibrás Ind. Química, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) dando uma concentração final de 0,8 µg/100µl de solução. Esta dose foi aplicada diariamente nos animais e foi suficiente para induzir níveis séricos médios de 17 β-estradiol de 736 pg/ml, conforme procedimento de padronização realizado anteriormente em nosso laboratório. O tratamento foi iniciado 2 dias antes da indução da EAE através de injeções subcutâneas (s.c.) e se estendeu até o quarto dia pós-indução considerando-se o dia da indução como dia 0. Portanto, os camundongos foram tratados por 7 dias consecutivos e foram sacrificados no 21º dia pós-indução, dia em que foram realizados os experimentos propostos. O sacrifício foi realizado através de uma dose letal de Xilazina 2% (Konig, São Paulo, SP, Brasil) e Ketamina 10% (Syntec, Cotia, SP, Brasil) por via intra-peritoneal. Para o preparo do anestésico, foram utilizados 1,75 ml de Ketamina 10%, 0,6 ml de Xilazina 2% e 4,6 ml de cloreto de sódio, dando um total de 6,95 ml de solução, da qual cada camundongo recebeu 300 µl.

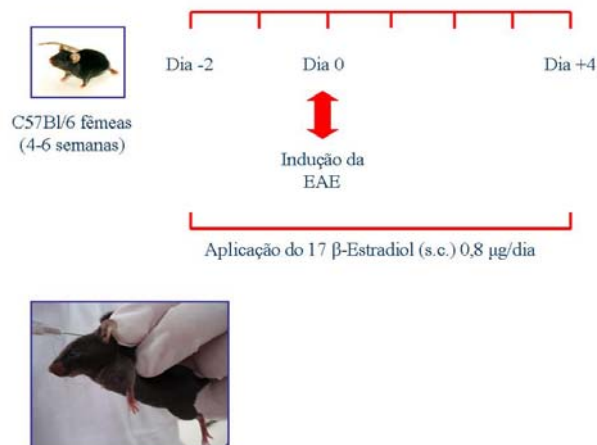


Figura 4 - Protocolo de tratamento com o 17 β-Estradiol
Fonte - A autora

3.5 AVALIAÇÃO DO CURSO CLÍNICO DA EAE

Os camundongos foram pesados (Micronal B6000, São Paulo, SP, Brasil) desde o dia em que se iniciou o tratamento (dia -2), até o dia do sacrifício (21º dia pós-imunização). Os animais, também, foram avaliados através dos sinais clínicos apresentados durante todo o período de avaliação do peso, obedecendo-se a uma escala de incapacidade neurológica (TABELA 1). Através desta escala, foram avaliados, separadamente, os sinais clínicos observados na cauda, nas patas traseiras, nas patas dianteiras e na bexiga dos animais. Para cada parte do corpo foram atribuídos valores arbitrários que eram dados aos animais por dia de avaliação, conforme a tabela abaixo, e o valor correspondente a cada parte do corpo era somado para se obter a pontuação clínica do animal naquele dia. Ao final do período de avaliação foi feita uma média diária de cada grupo.

TABELA 1 - Escala de Incapacidade Neurológica
Fonte - DE PAULA *et al.*, 2008

PORTE DO CORPO	SINAIS CLÍNICOS	PONTUAÇÃO
CAUDA	Sem sinais clínicos.	0
	Perda do tônus muscular na 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
PATAS DIANTEIRAS	Paralisia de ambas as patas.	4
	Sem sinais clínicos.	0
	Fraqueza de qualquer pata.	1
BEXIGA	Paralisia de qualquer pata.	2
	Continência.	0
	Incontinência.	1
Pontuação numérica estabelecida arbitrariamente.		

3.6 PREPARAÇÃO DOS CORTES E COLORAÇÃO POR HE PARA AVALIAÇÃO DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO CEREBRAL

Para avaliação de infiltrados inflamatórios a parte posterior do cérebro, obtida através de secção frontal, isto é, secção paralela aos planos ventral e dorsal, foi fixada em solução de formaldeído tamponado 10% por 10 dias. Logo após os fragmentos receberam 3 banhos de álcool etílico absoluto de 30 minutos de duração cada um e 2 banhos de xilol, também, por 30 minutos cada um. Finalmente foram realizados 2 banhos de parafina com 60 minutos de duração após os quais foram realizadas as inclusões dos fragmentos na parafina de inclusão e realizados cortes de 6µm de espessura. As lâminas foram submetidas, então, a 3 banhos em xilol e 3 em álcool absoluto por 5 minutos cada um. Em seguida as lâminas foram lavadas em água corrente e destilada por 5 e 2 minutos, respectivamente, coradas com hematoxilina por 3 minutos, lavadas novamente em água corrente e destilada pelo mesmo tempo e coradas com eosina por 2 minutos. Em seguida foi realizada uma bateria de descoloração na qual as lâminas foram imersas por 3 vezes consecutivas em 3 banhos de álcool absoluto num total de 9 imersões e permaneceram por 3 minutos em 3 banhos de xilol. Após o último banho as lâminas foram montadas com goma de Damar (Proquímios Com. e Ind., Rio de Janeiro, RJ, Brasil) para posterior avaliação dos infiltrados inflamatórios.

3.7 MARCAÇÃO DE LINFÓCITOS T, B E MACRÓFAGOS PARA AVALIAÇÃO POR IMUNOHISTOQUÍMICA

A imunohistoquímica foi feita em cortes de parafina obtidos conforme descrito no item anterior. Foram utilizados os seguintes anticorpos: anti-CD3 – diluição 1:1500 (Dako policlonal cód. A0452, Los Angeles, CA, USA), anti-CD20 – diluição 1:1000 (Dako clone L26 cód. MO755, Los Angeles, CA, USA) e anti-CD68 – diluição 1:1000 (Dako clone PGM1, Los Angeles, CA, USA). As lâminas foram incubadas

com tampão citrato pH 6.0 em banho-maria por 40 minutos. Vinte minutos após a retirada das lâminas do banho-maria, a atividade da peroxidase endógena foi bloqueada através da imersão em peróxido de hidrogênio 3% e metanol 70% durante 20 minutos. Após esta etapa, as lâminas foram lavadas em água destilada e foi aplicado o anticorpo previamente diluído em uma solução de PBS-TWIN20+BSA 0,1%. Após incubação por 24 horas foi aplicado o EasyPath Super ABC KIT Universal. A seguir foi adicionado o cromógeno DAB (Dako cód. K3466, Los Angeles, CA, USA) por 30 segundos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada e coradas em hematoxilina de Harris e desidratadas em álcool com concentrações crescentes de 50%, 70%, 90% e P.A. e 4 banhos de xilol. A montagem das lâminas foi feita com goma de Damar (Proquímios Com. e Ind, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Posteriormente, foi realizada uma avaliação qualitativa da presença de linfócitos T, linfócitos B e macrófagos. Os cortes foram avaliados quanto à ausência ou presença de células em quantidades pequenas, moderadas ou grandes.

3.8 PREPARAÇÃO DE CÉLULAS ESPLÊNICAS PARA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MARCADORES ATRAVÉS DE CITOMETRIA DE FLUXO

Para avaliar a expressão de marcadores por células esplênicas, a metade superior do baço, obtida através de secção horizontal, foi macerada em 500 µl de RPMI incompleto. Foi feita a centrifugação por 10 minutos a 1200 rpm a 2°C. O sobrenadante foi desprezado, foi acrescentado 1 ml de água destilada e as células foram homogeneizadas por 20 segundos sendo, então, acrescentados 14 ml de RPMI incompleto. Novamente as células foram centrifugadas por 10 minutos a 1200 rpm a 2°C, o sobrenadante foi desprezado e os sedimentos foram ressuspensos em 350 µl de PBS. Foi colocado 50 µl desta solução em cada tubo de citometria onde foi acrescentado 10 µl de anticorpos monoclonais (anti-CD4, anti-CD8, anti-CD19, anti-CD28/CD3, anti-CD152/CD3, CD80/CD11 e CD86/CD11) (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA.). Foram utilizados controles isotípicos de rato marcados com ficoeritrina e fluoresceína. Após 20 minutos de incubação em ambiente escuro e no gelo, foi feita a leitura através do aparelho FACScalibur-BD (Becton Dickinson, San

Jose, CA, USA) em ambiente climatizado a 20° C, sendo as análises feitas, utilizando-se 10.000 eventos para cada amostra. As células marcadas foram, então, selecionadas através de tamanho e granulosidade e analisadas através do software CellQuest R (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

3.9 DOSAGEM DE CITOCINAS EM SOBRENADANTE DE MACERADO CEREBRAL E ESPLÊNICO

Para a dosagem de IFN- γ , TNF- α , IL-17, TGF- β , IL-6 e IL-10 em macerado de cérebro e de baço, foram utilizadas secção frontal do cérebro e secção transversal do baço. A porção anterior do cérebro e a metade inferior do baço foram maceradas em 1 ml de tampão de extração de citocinas: 0,4 M de NaCl (Isofar Indústria e Comércio), 0,05% de tween 20 (Isofar Indústria e Comércio), 0,5% de soro-albumina bovina - BSA (Sigma), 0,1 M de fluoreto de fenil-metil-sulfonil - PMSF (Sigma), 0,1 M de cloreto de benzetônio - BC (Sigma), 10 mM de ácido etileno diamino tetracético - EDTA (Sigma) e 20 pM de aprotinina - AP (Sigma). Em seguida, o homogeneizado do baço e do cérebro foi centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos a 4° C e os sobrenadantes foram coletados e congelados a -70 °C. As concentrações de IFN- γ , TNF- α , TGF- β , IL-6, IL-10 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, EUA) e IL-17 (eBioscience, San Diego, CA, USA) foram determinadas pelo método ELISA de acordo com os procedimentos recomendados pelos fabricantes (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, EUA e eBioscience, San Diego, CA, USA). Os níveis de citocinas foram expressos em picogramas por mililitro (pg/ml).

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram representados pela média \pm erro-padrão. Foram utilizados, *two-way* ANOVA para as análises de peso, pontuação clínica e determinação dos marcadores celulares e *one-way* ANOVA para dosagem das citocinas Ambos os testes foram seguidos pelo Teste de Comparações Múltiplas de

Bonferroni (GraphPad Prism 5.00). As diferenças foram consideradas significantes para $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DO CURSO CLÍNICO DA EAE

A avaliação do curso clínico da EAE foi feita através do peso corporal (g) (Fig. 5A) e da pontuação clínica dos animais (Fig 5B). Os camundongos pertencentes ao grupo EAE perderam peso corporal em comparação com os camundongos pertencentes aos grupos controle e EAE tratado (Fig. 5A). Entretanto, esta diminuição de peso foi significativa apenas nos dias 17, 18 e 20 pós-indução com relação ao grupo EAE tratado ($p < 0,05$). Além disso, no 1º dia pós-indução tanto os animais do grupo EAE tratado quanto os do grupo EAE perderam peso, porém, os camundongos tratados com o 17 β -Estradiol começaram a recuperar o peso no 2º dia pós-indução, enquanto que os camundongos do grupo EAE só iniciaram a recuperação do peso no 4º dia pós-indução.

A pontuação clínica do grupo EAE começou no 14º dia pós-indução e atingiu o pico no 19º, com média de 3,28 pontos (paralisia da cauda e de ambas as patas traseiras e fraqueza de uma das patas dianteiras, ou seja, pontuação clínica individual de 7), enquanto que, no grupo EAE tratado, a pontuação clínica começou no 19º dia pós-indução e atingiu o pico no 20º, com média de 0,83 pontos (paralisia da cauda e de uma pata traseira, ou seja, pontuação clínica individual de 5) (Fig. 5B). Entretanto, apenas nos dias 18, 19, 20 e 21 pós-indução, a pontuação clínica no grupo EAE tratado foi menor que no grupo EAE ($p < 0,001$).

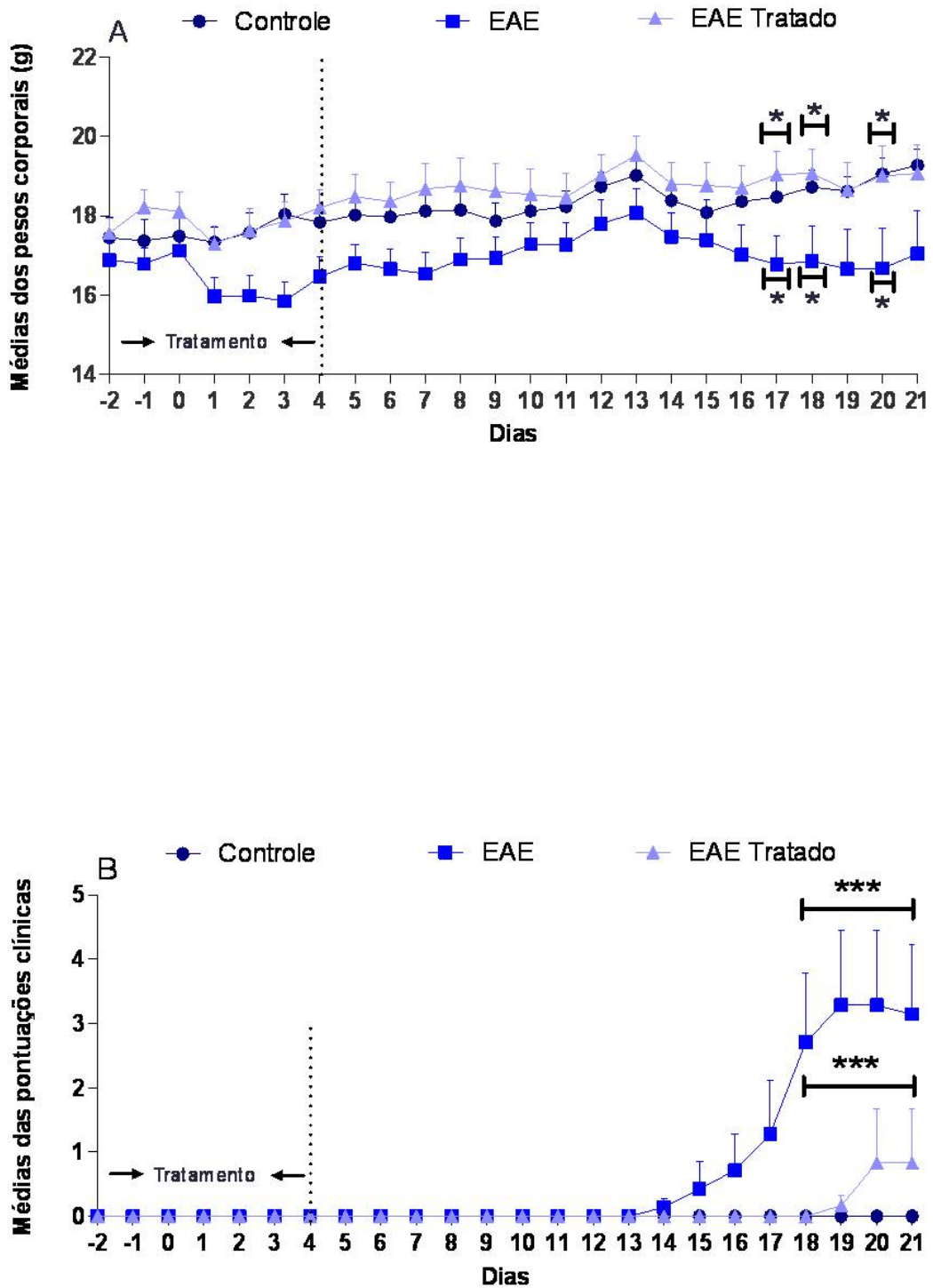


Figura 5 - Sinais clínicos da EAE nos grupos controle (n = 6), EAE (n = 6) e EAE tratado (n = 6). (A) Média do peso corporal (g) (B) Média da pontuação clínica. Cada ponto representa a média aritmética \pm SEM. *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$.

4.2 AVALIAÇÃO DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO CEREBRAL POR HE

Para avaliação do infiltrado inflamatório no tecido cerebral os cortes foram coradas por HE. A análise foi feita pela Professora Doutora Rosa Maria Esteves Arantes do Laboratório de Neuro-Imunologia, Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

Os animais do grupo EAE mostraram, apenas quando portadores de pontuação clínica 6 (paralisia da cauda e de ambas as patas traseiras) ou 7 (paralisia da cauda e de ambas as patas traseiras e fraqueza de uma das patas dianteiras), a presença de infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear, congestão vascular da meninge na superfície cortical ou nos sulcos corticais (setas grossas nas figs. 6A e 6B). O infiltrado não foi visível no parênquima cerebral, mas notou-se a presença de pequenos vasos congestionados, às vezes, com formatos em pé-de-galinha (seta fina na fig. 6B), com reatividade endotelial, sinais de discreto edema perivascular e de alterações degenerativas neuronais (eosinofilia citoplasmática) ou evidências de apoptose (seta longa na fig. 6C).

Os animais do grupo EAE tratado sem sinais clínicos não desenvolveram lesões histopatológicas. As setas grossas nas figs. 6D e 6E indicam ausência de infiltrado celular inflamatório e a seta fina na fig. 6F mostra um neurônio preservado.

Os animais do grupo controle apresentaram estruturas cerebrais de aspecto histológico habitual, sem lesões parenquimatosas, vasculares ou meníngeas.

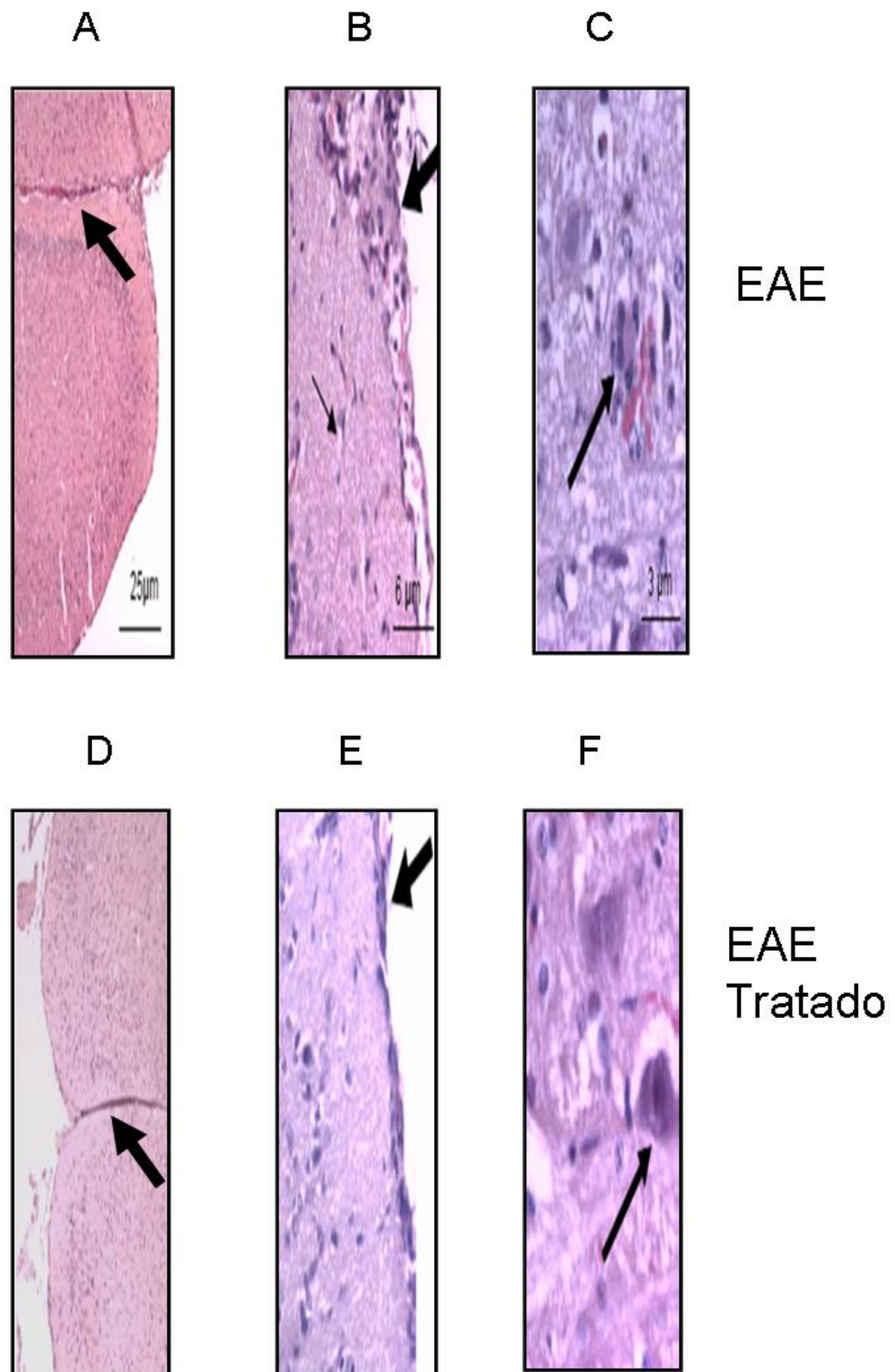


Figura 6 - Cortes cerebrais corados por HE EAE (n = 6) e EAE tratado (n = 6). EAE com pontuação clínica 7 (A, B, C). EAE tratado com pontuação clínica 0 (D, E, F). Os aumentos foram de 400X exceto figuras B e E que foram de 200X

4.3 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE LINFÓCITOS T, B E MACRÓFAGOS POR IMUNOHISTOQUÍMICA

Para avaliação dos marcadores celulares no tecido cerebral por imunohistoquímica os cortes foram corados com os seguintes marcadores: anti-CD3 (linfócitos T), anti-CD20 (linfócitos B) e anti-CD68 (macrófagos). A análise foi realizada pelo Professor Doutor Rogério Estevam Farias do Setor de Histologia e Embriologia, Departamento de Morfologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Os cortes marcados com anti-CD3 mostraram pequena quantidade de linfócitos T, localizados na meninge, no grupo EAE tratado (Fig. 7A), enquanto que, no grupo EAE foi observada grande quantidade de linfócitos T, também na meninge (Fig. 7B). No grupo controle não houve infiltração (Fig. 7C).

Os cortes marcados com anti-CD20 apresentaram quantidade moderada de linfócitos B intravasculares, localizados na meninge, no grupo EAE tratado (Fig 8A), pequena quantidade de linfócitos B, também na meninge, no grupo EAE (Fig. 8B) e ausência de infiltração no grupo controle (Fig.8C).

Nos cortes marcados com anti-CD68 foram observados pequena quantidade de macrófagos, localizados na meninge, no grupo EAE tratado (Fig. 9A), quantidade moderada de macrófagos, também na meninge, no grupo EAE (Fig. 9B) e ausência de infiltração no grupo controle (Fig. 9C).

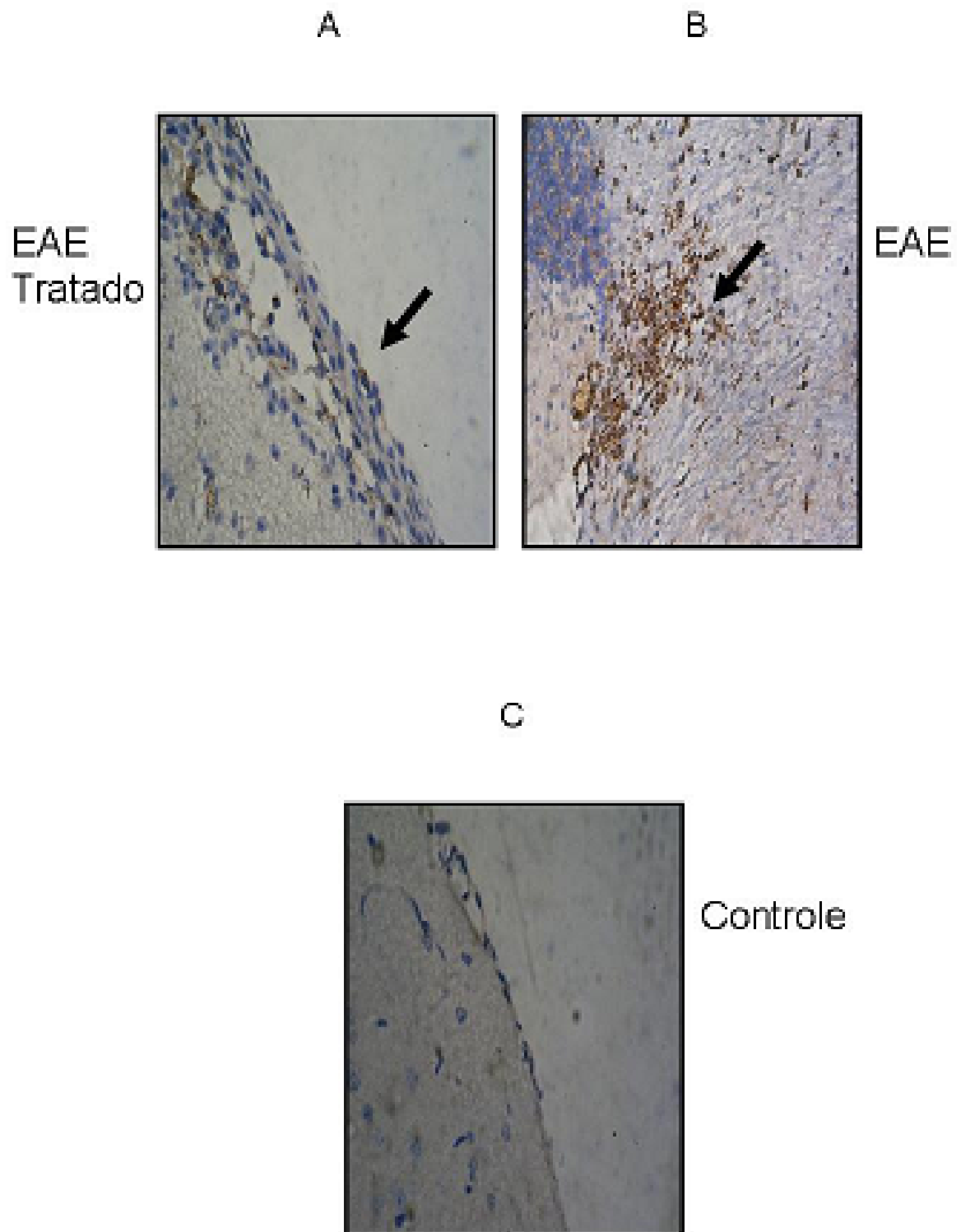


Figura 7 - Cortes cerebrais marcados com anti-CD3 nos grupos controle (n = 6), EAE (n = 6) e EAE tratado (n = 6). (A) Grupo EAE tratado, (B) Grupo EAE, (C) Grupo controle. Aumento de 400X. O infiltrado está indicado com seta branca.

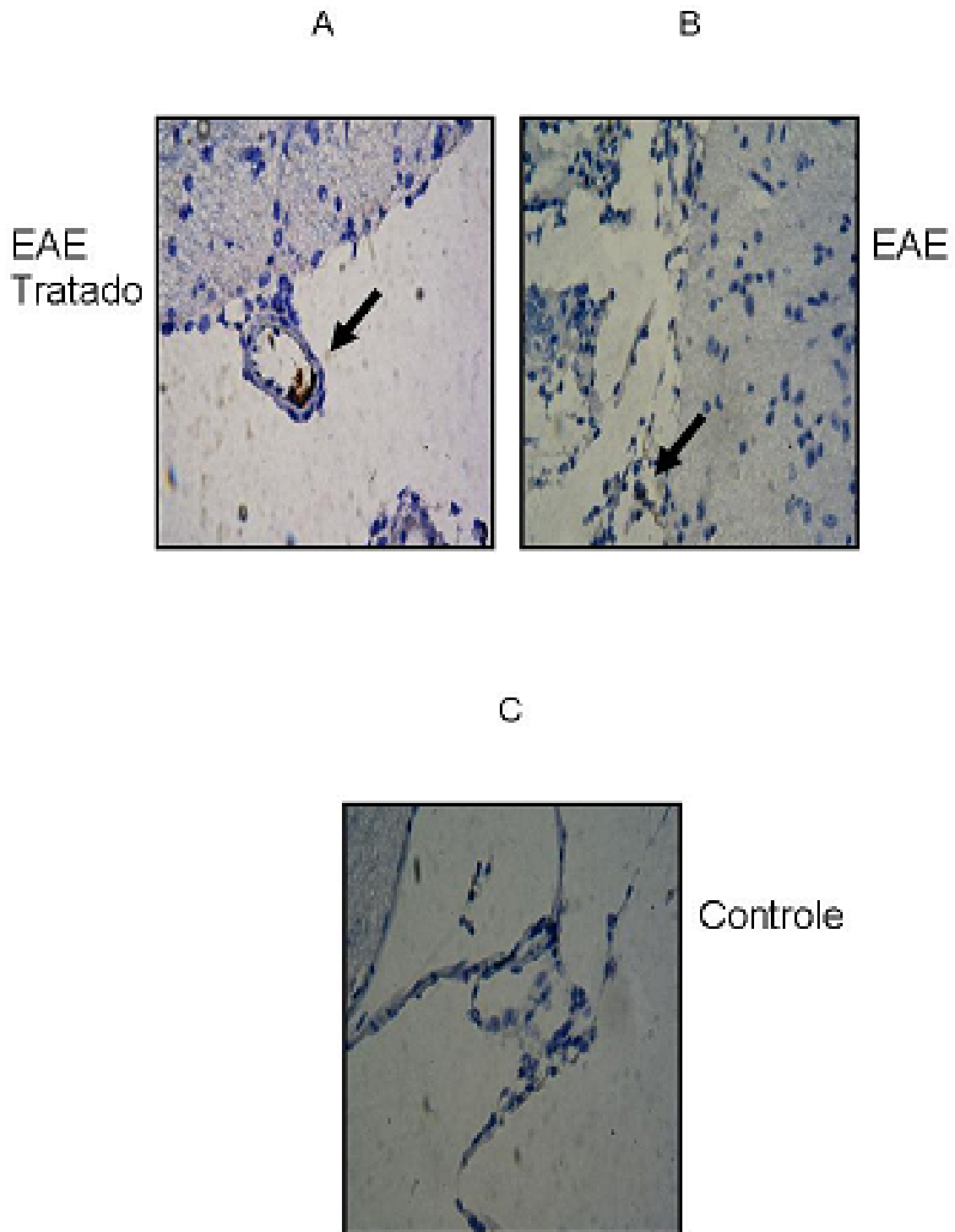


Figura 8 - Cortes cerebrais marcados com anti-CD20 nos grupos controle (n = 6), EAE (n = 6) e EAE tratado (n = 6). (A) Grupo EAE tratado, (B) Grupo EAE, (C) Grupo controle. Aumento de 400X. O infiltrado está indicado com seta branca.

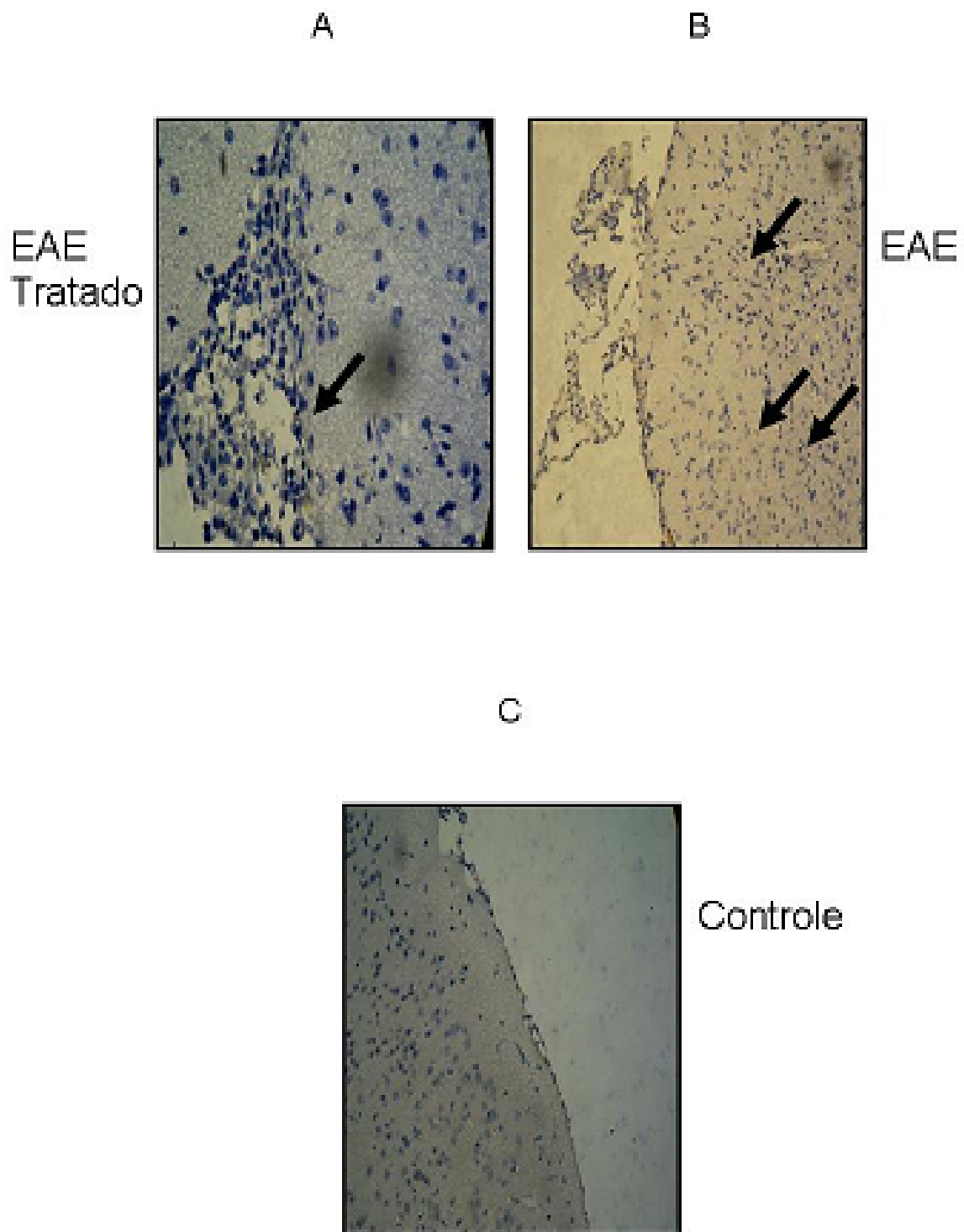


Figura 9 - Cortes cerebrais marcados com anti-CD68 nos grupos controle (n = 6), EAE (n = 6) e EAE tratado (n = 6). (A) Grupo EAE tratado, (B) Grupo EAE, (C) Grupo controle. Aumento de 400X. O infiltrado está indicado com seta branca.

4.4 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MARCADORES EM CÉLULAS ESPLÊNICAS ATRAVÉS DE CITOMETRIA DE FLUXO

Foi feita marcação nas células esplênicas para a detecção dos seguintes marcadores: CD4, CD8, CD19, CD28/CD3, CD152/CD3, CD80/CD11 e CD86/CD11.

A Fig. 10A mostra o número relativo de células esplênicas marcadas com anti-CD4, anti-CD8 e anti-CD19. Observou-se aumento na expressão de CD19, marcador de linfócitos B, nos grupos controle e EAE tratado com relação ao grupo EAE ($p < 0,001$).

Com relação à intensidade média de fluorescência das células marcadas com anti-CD28/CD3, anti-CD152/CD3, anti-CD80/CD11 e anti-CD86/CD11 não se observou alteração entre os grupos (Fig. 10B).

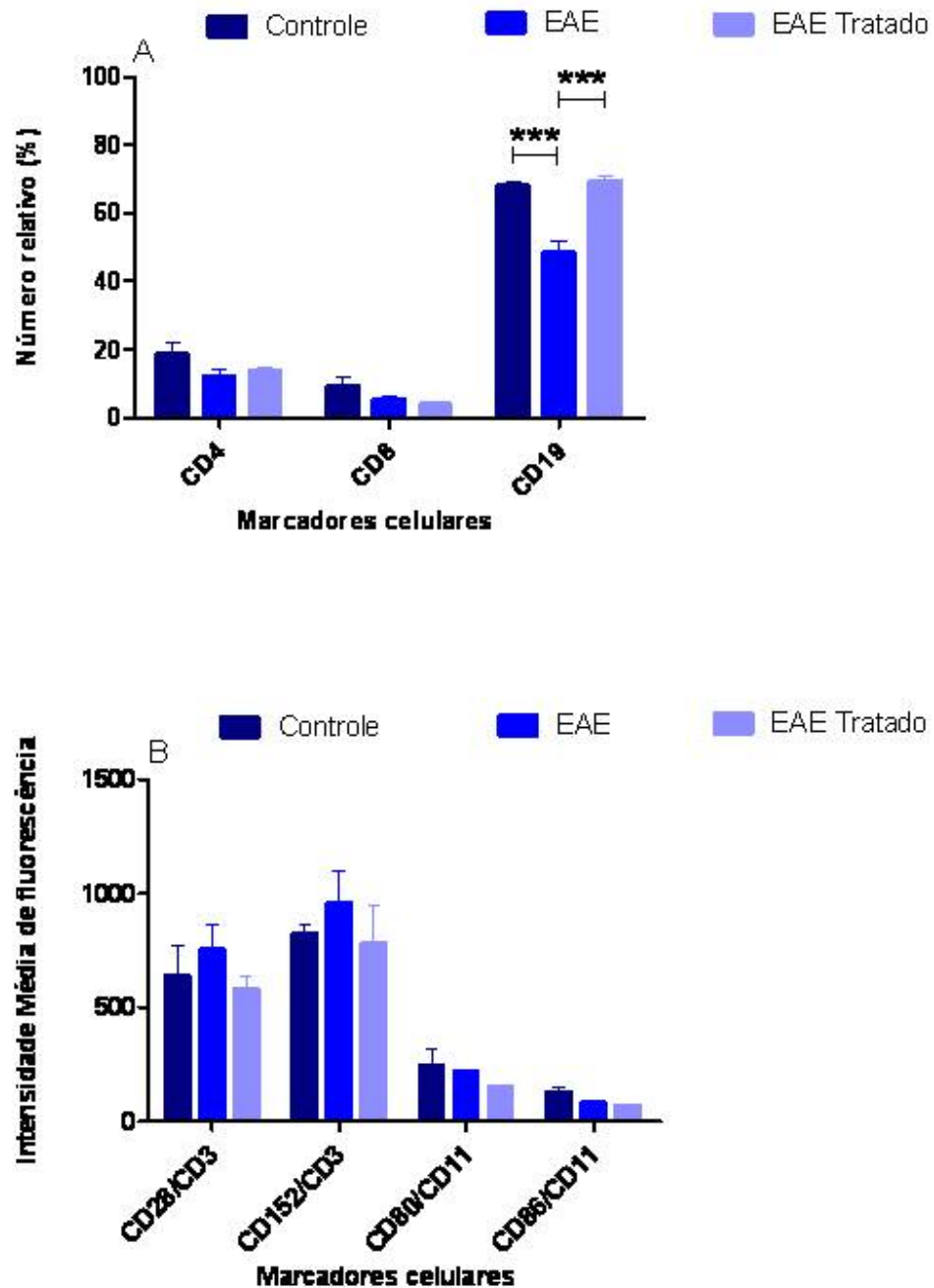


Figura 10 - Número relativo de CD4, CD8 e CD19 (A) e intensidade média de fluorescência de CD28/CD3, CD152/CD3, CD80/CD11 e CD86/CD11 (B) em esplenócitos por citometria de fluxo nos grupos controle (n = 6), EAE (n = 6) e EAE tratado (n = 6). Cada barra representa a média aritmética \pm SEM. *, $p < 0,001$.

4.5 DOSAGEM DE CITOCINAS EM SOBRENADANTE DE MACERADO CEREBRAL E ESPLÊNICO

O tratamento com 17 β -Estradiol durante 7 dias alterou a produção de citocinas no cérebro (resposta à EAE no órgão alvo) dos camundongos. A Fig. 11 mostra que houve aumento de TNF- α , IL-17, IL-6 e TGF- β e diminuição de IL-10 nos animais com EAE quando comparados ao grupo controle. Entretanto, nos animais tratados com 17 β -Estradiol houve diminuição de IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-6 e TGF- β e aumento de IL-10 quando comparados com os animais do grupo EAE.

Um padrão de citocinas similar ao observado no sobrenadante de macerado cerebral foi visto no sobrenadante de macerado esplênico, ou seja, altos níveis das citocinas IFN- γ e TNF- α (Figs. 12A e B) e baixos níveis de IL-10 (Fig. 12F) foram observados no grupo EAE em comparação ao grupo controle. Quando comparados os grupos EAE e EAE tratado, o grupo EAE tratado apresentou dosagens mais baixas de IFN- γ , TNF- α e IL-17 (Figs. 12A, B e C). Entretanto, os níveis de IL-10 estavam maiores no grupo EAE tratado em relação ao grupo EAE (Fig. 12F).

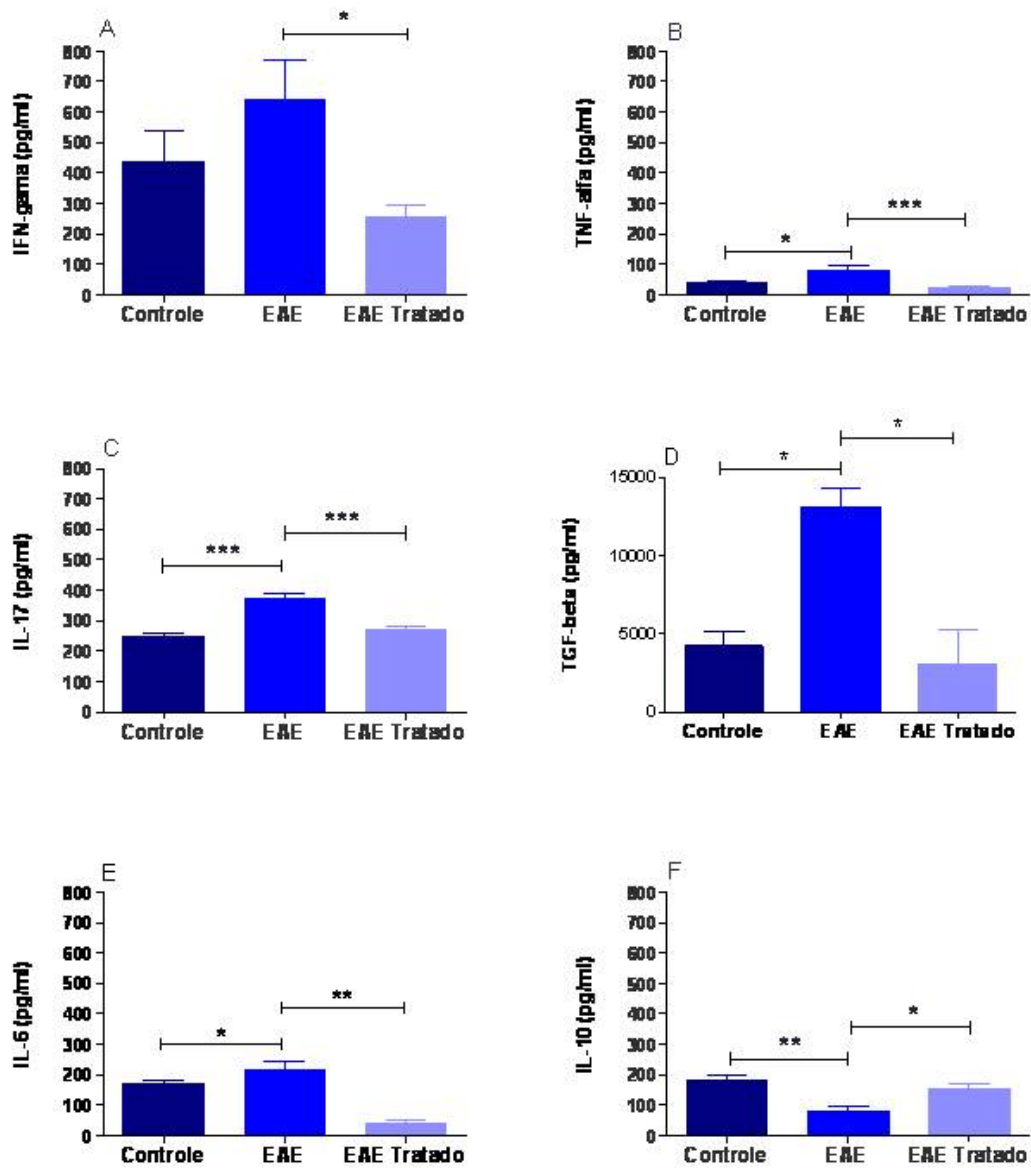


Figura 11 - Dosagem de citocinas em sobrenadante de macerado cerebral nos grupos controle (n = 6), EAE (n = 6) e EAE tratado (n = 6). (A) IFN- γ , (B) TNF- α , (C) IL-17, (D) TGF- β , (E) IL-6 e (F) IL-10. Cada barra representa a média aritmética \pm SEM. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

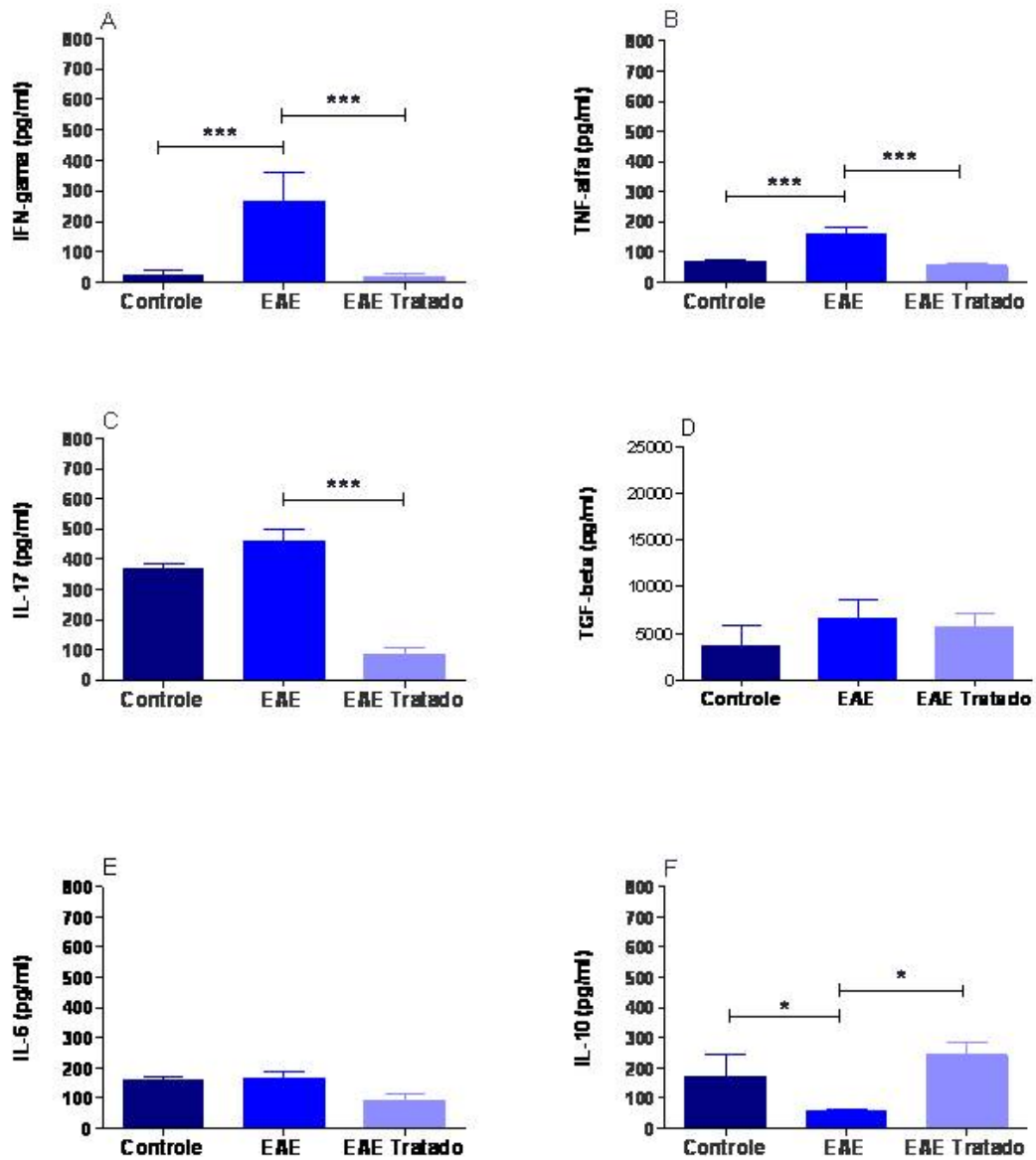


Figura 12 - Dosagem de citocinas em sobrenadante de macerado esplênico nos grupos controle (n = 6), EAE (n = 6) e EAE tratado (n = 6). (A) IFN- γ , (B) TNF- α , (C) IL-17, (D) TGF- β , (E) IL-6 e (F) IL-10. Cada barra representa a média aritmética \pm SEM *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

5 DISCUSSÃO

Este trabalho investigou os efeitos do tratamento com 17 β -Estradiol, no modelo de EAE, em camundongos C57Bl/6 imunizados com peptídeo MOG₃₅₋₅₅. O tratamento com este hormônio reduziu a gravidade da EAE em comparação com os animais não tratados.

Os primeiros dados observados mostraram que os camundongos pertencentes ao grupo EAE perderam peso corporal, enquanto que os camundongos dos grupos controle e EAE tratado mantiveram o peso. Esta perda de peso já havia sido associada com a fase aguda da doença num modelo de EAE induzido por uma combinação de PBM e MOG na primeira geração de camundongos obtida com o cruzamento das linhagens PL/J e SJL/J. Este trabalho mostrou que a paralisia era acompanhada por perda de peso (LEADBETTER *et al.*, 1998). Encinas e colaboradores (2001), utilizando um modelo de EAE induzido por PLP₁₃₉₋₁₅₁ em camundongos obtidos pelo cruzamento da linhagem resistente B10.S com a linhagem susceptível SJL/J, confirmaram estes resultados e sugeriram que a perda de peso seja um efeito dos mediadores inflamatórios e/ou resultado da falta de apetite dos animais. Além disso, um trabalho recente realizado por nosso grupo, no qual a EAE foi induzida por MOG₃₅₋₅₅ em camundongos C57Bl/6, também correlacionou a perda de peso com os sinais clínicos da EAE (DE PAULA *et al.*, 2008).

Os sinais clínicos da doença no grupo EAE surgiram no 14º dia pós-indução e atingiram o pico no 19º, enquanto que, no grupo EAE tratado, os mesmos sinais começaram no 19º dia pós-indução e atingiram o pico no 20º. As principais características clínicas observadas foram flacidez da cauda e paralisia dos membros posteriores. Neste trabalho os animais foram tratados com uma dose diária de 17 β -Estradiol de 0,8 μ g, a qual foi suficiente para induzir níveis séricos médios de 736 pg/ml, sendo que este valor corresponde cerca de 6 vezes o valores do estro murino. Já havia sido demonstrado por Bebo Junior e colaboradores (2001) que doses de 17 β -Estradiol correspondentes ao diestro (20 a 30 pg/ml), estro (100 a 200 pg/ml) e prenhez (5000 a 10000 pg/ml) foram protetoras em modelo murino de EAE e que o 17 β -Estradiol reduziu as manifestações clínicas da doença numa relação

dose-dependente. Além disso, Polanczyk e colaboradores (2003), em um modelo de EAE induzido por MOG₃₅₋₅₅ em camundongos B6.129 deficientes em RE α ou RE β , demonstraram que o tratamento com 17 β -Estradiol, resultou em ausência de lesões inflamatórias no SNC dos animais deficientes em RE β , sugerindo que este hormônio confere efeitos neuroprotetores via RE α .

Isto pode levantar a hipótese de que um aumento na expressão do RE α possa ser neuroprotetora, mesmo na presença de níveis baixos de 17 β -Estradiol. Um estudo que avaliou os mecanismos neuroprotetores do 17 β -Estradiol em modelo murino de acidente vascular encefálico (AVE) isquêmico, usando animais ovariectomizados, deficientes em receptor RE α ou RE β e tratados com 17 β -Estradiol, confirmou que os efeitos neuroprotetores deste hormônio ocorrem via RE α e mostrou que a neuroproteção obtida foi independente dos níveis hormonais circulantes no cérebro, sugerindo que o aumento de expressão do RE α ocorra devido a um mecanismo de “feedback” positivo, ou seja, quanto menores os níveis de 17 β -Estradiol num determinado local, maior é a expressão do RE α neste mesmo local (DUBAL et al., 2001).

A análise histopatológica no cérebro dos animais, realizada no 21º dia pós-indução através da coloração com HE, mostrou que apenas os animais do grupo EAE com pontuação clínica mais alta apresentaram infiltrados inflamatórios predominantemente mononucleares e congestão vascular da meninge na superfície cortical ou nos sulcos corticais. O infiltrado não foi visível no parênquima cerebral, mas notou-se a presença de pequenos vasos congestionados, sinais de discreto edema perivascular e de alterações degenerativas neuronais ou de apoptose, bem como aspecto vacuolado periaxonal em algumas áreas subcorticais e periventriculares. Estes resultados corroboram com aqueles obtidos por Morales e colaboradores (2006) os quais mostraram em camundongos C57Bl/6 imunizados com MOG₃₅₋₅₅ que nos sítios de infiltrados celulares inflamatórios, na medula espinhal, ocorrem desmielinização extensiva e perda axonal, sendo que o tratamento com “Propyl Pyrazole Triol” (PPT), um ligante altamente seletivo de RE α , foi capaz de prevenir esta perda.

Os resultados da análise histopatológica correlacionaram-se com aqueles obtidos nos estudos de imunohistoquímica para a avaliação dos marcadores de linfócitos T, linfócitos B CD20⁺ e macrófagos nos quais foram observados aumento de linfócitos T e macrófagos no cérebro dos animais com EAE e aumento de

linfócitos B CD20⁺ no grupo EAE tratado, bem como, diminuição de linfócitos T e macrófagos. Ainda neste grupo, foram observados níveis maiores de IL-10 no cérebro e baço e aumento na expressão de CD19 pelas células esplênicas.

Sabe-se que o CD20 é um marcador específico de linfócitos B expresso desde os primeiros estágios de maturação do linfócito pré-B, mas perdido durante a diferenciação em plasmócitos (MATSUSHITA *et al.*, 2008). Além disso, em um trabalho de revisão recente, foi mostrado que após a indução da EAE, receptores do tipo “toll-like” de células dendríticas são ativados pelos componentes das micobactérias direcionando a expansão de linfócitos T CD4⁺ auto-reativos “naive” para Th1 e Th17, sendo que na ausência de linfócitos B ocorre maior expansão destas células (BOUAZIZ *et al.*, 2009). Por outro lado, a estimulação concomitante e precoce de linfócitos B, através de receptores “toll-like” 4 e 9 (TLR4 e TLR9) induz a produção de IL-10 a qual limita a expansão dos linfócitos T auto-reativos levando à resolução da doença (LAMPROPOULOU *et al.*, 2008).

Além disso, alguns autores já demonstraram que a progressão da EAE é mais grave em camundongos deficientes em CD19, um marcador de linfócitos B. Matsushita e colaboradores (2006) examinaram o papel do CD19 no desenvolvimento da EAE usando camundongos “knock out” para este marcador. A ausência de CD19 foi associada com a presença de linfócitos Th1 no SNC e maior gravidade da EAE. Estes autores sugeriram que o CD19 modula o balanço de citocinas Th1/Th2, além de desempenhar um papel crítico como molécula supressora no desenvolvimento da EAE.

No presente trabalho, foi observado uma diminuição das citocinas inflamatórias IFN- γ , TNF- α e IL-17 no cérebro e baço dos animais tratados com 17 β -Estradiol. Estes resultados podem estar relacionados com a diminuição do infiltrado inflamatório já descrito anteriormente, uma vez que linfócitos T e macrófagos são responsáveis pela produção destas citocinas.

Apesar deste trabalho ter correlacionado a diminuição de IFN- γ no grupo EAE tratado com a melhora dos sinais clínicos e dos achados histopatológicos, existem controvérsias quanto ao papel desta citocina na proteção ou exacerbação da EAE. Um trabalho mais antigo relatou que a administração de IFN- γ melhora a EAE (VOORTHUIS *et al.*, 1990). Estes autores utilizaram o modelo de EAE induzido por homogenato de medula espinhal de cobaia em ratos Lewis e administraram IFN- γ 37,5 x 10³ U) no interior dos ventrículos cerebrais. Esta administração resultou em

completa supressão dos sinais clínicos da EAE. Além disso, eles verificaram que a administração sistêmica de anticorpos monoclonais anti-IFN- γ resultava numa forma de EAE mais grave.

Porém, trabalhos mais recentes sugerem que o IFN- γ exacerba o curso da EAE. Tanuma e colaboradores (1999) avaliaram o papel desta citocina na EAE, também, induzida por homogenato de medula espinhal de cobaias em ratos Lewis, os quais desenvolveram uma doença similar à EMRR. A expressão de mRNA de IFN- γ no cérebro dos animais, quantificada por PCR competitivo, se mostrou baixa no primeiro surto. Após injeções intraventriculares de IFN- γ ($3,0 \times 10^4$ U) os animais apresentaram um número maior de surtos em relação aos controles ou uma forma letal da doença. Os autores concluíram que os níveis de IFN- γ são proporcionais à gravidade da EAE.

Posteriormente, Balabanov e colaboradores (2007) mostraram que existe uma interação entre IFN- γ e oligodendrócitos. Estes autores usaram um modelo de EAE induzido com MOG₃₅₋₅₅ em camundongos geneticamente modificados cujos oligodendrócitos não respondiam ao IFN- γ . Os animais desenvolveram uma doença com início precoce e caracterizada por apoptose dos oligodendrócitos. Por outro lado, estes mesmos autores, também, realizaram um estudo *in vitro* no qual oligodendrócitos foram tratados com IFN- γ e aumentaram a expressão de genes envolvidos na proteção contra estresse oxidativo, como os genes da enzima superóxido dismutase, sugerindo que a interação entre oligodendrócitos e IFN- γ determina o curso da EAE, mas pouco se sabe ainda a respeito destas interações.

Sabe-se que na EAE, o TNF- β , produzido por linfócitos T, aumenta antes do início dos sinais clínicos, enquanto que os picos de TNF- α , produzidos por fagócitos mononucleares, ocorrem durante as manifestações clínicas, contribuindo para a gravidade e a duração dos surtos (ISSAZADEH *et al.*, 1995). Neste trabalho os níveis de TNF- α estavam diminuídos nos animais tratados com 17 β -Estradiol em comparação com os não-tratados, tanto no cérebro quanto no baço dos animais. Estes resultados estão em concordância com aqueles obtidos por Ito e colaboradores (2002) num trabalho que investigou os efeitos do 17 β -Estradiol na expressão de TNF- α em cérebro e baço de camundongos com EAE e observou, por citometria de fluxo, que o tratamento reduziu a expressão desta citocina tanto por macrófagos infiltrados no SNC, quanto pela micróglia, e, também, pelos macrófagos

esplênicos. Portanto, parece que o TNF- α está envolvido nos mecanismos de proteção induzidos por 17 β -Estradiol, tanto a nível sistêmico (baço), quanto local (SNC).

Além disso, Matejuk e colaboradores (2002) avaliaram os efeitos do tratamento com 17 β -Estradiol na expressão gênica de camundongos B10.PL imunizados com PBM, através da técnica de microarranjo, e concluíram que este hormônio inibe os genes de TNF- α . Um trabalho mais antigo já havia mostrado que a super-expressão de TNF- α causa uma doença desmielinizante enquanto que a neutralização desta citocina com anticorpos monoclonais é protetora em modelo de EAE induzido por PBM usando camundongos SJL/J (RUDDLE *et al.*, 1990).

Ainda em relação às citocinas pró-inflamatórias, foram observados, neste trabalho, níveis mais elevados de IL-17 nos camundongos com EAE, sendo que a produção desta citocina foi menor nos animais tratados com 17 β -Estradiol. Estes resultados corroboram com aqueles obtidos por Hofstetter e colaboradores (2007) num trabalho que avaliou o perfil de citocinas produzidas por linfócitos T efetores na periferia (baço e linfonodos) e no SNC em vários estágios da EAE induzida por PLP em camundongos SJL/J. O trabalho mostrou uma alta frequência de linfócitos Th17 específicos para os auto-antígenos os quais, antes do início da doença, estavam localizados apenas na periferia. Porém, durante a fase aguda da EAE, eles se mostraram presentes tanto na periferia, quanto no SNC inflamado. Durante a recuperação da doença, os linfócitos Th17 foram detectados, ainda com alta frequência, porém, apenas na periferia.

Um outro trabalho realizado com camundongos C57Bl/6 “knock out” para IL-17, mostrou que a deficiência desta citocina na EAE induzida por MOG₃₅₋₅₅ reduz a susceptibilidade à doença bem como a sua gravidade clínica. Neste estudo, os animais exibiram atraso no início da doença, redução na gravidade da pontuação clínica, alterações histológicas reduzidas e recuperação precoce (KOMIYAMA *et al.*, 2006).

No presente trabalho, no cérebro dos animais tratados com 17 β -Estradiol houve diminuição de TGF- β e IL-6. Isto pode sugerir um mecanismo de ação do 17 β -Estradiol na diferenciação dos linfócitos Th17. Sabe-se que os linfócitos T CD4⁺ “naive” podem se diferenciar em diferentes subpopulações, de acordo com o micro ambiente de citocinas a que são expostos, e que o TGF- β , normalmente associado ao desenvolvimento de linfócitos T reguladores, na presença de IL-6 ou outras

citocinas pró-inflamatórias como IL-21 ou IL-22, induz a diferenciação dos linfócitos T CD4⁺ “naive” em linfócitos Th17 (XIE *et al.*, 2009).

O efeito imunomodulador do 17 β -estradiol, talvez, possa ser útil para o tratamento de outras doenças crônicas, além da EM, cujo desenvolvimento esteja associado ao aumento de IL-17. Chabaud e colaboradores (1999) avaliaram o papel da IL-17 na artrite reumatóide, Esta citocina foi quantificada em sobrenadantes de culturas de tecidos sinoviais afetados pela doença. Os resultados indicaram altos níveis de IL-17. Mais recentemente foi observado um aumento na frequência dos linfócitos Th17 e das citocinas relacionadas a eles como, IL-17, TGF- β e IL-6 em pacientes com leucemia mielóide aguda, e foi sugerido que a IL-17 desempenha um papel importante na patogênese desta doença (WU *et al.*,2009).

Tomados em conjunto os resultados obtidos neste trabalho não permitem afirmar se o tratamento com o 17 β -Estradiol diminuiu as citocinas inflamatórias e esta diminuição levou ao aumento da produção de IL-10, ou se foi o contrário. Talvez um ensaio de linfoproliferação *in vitro* ou uma cinética da EAE possam responder a esta questão. Também não ficou claro através da dosagem de TGF- β e IL-6 se o 17 β -Estradiol influencia os mecanismos de diferenciação de linfócitos T CD4⁺ “naive” em linfócitos Th17. Possivelmente, a dosagem de outras citocinas envolvidas neste mecanismo, como a IL-23, importante na sobrevivência e expansão dos linfócitos Th17, e a IL-27 que atua inibindo a diferenciação destes linfócitos, possa contribuir para esta elucidação. Além disso, seria interessante fazer uma avaliação de células cerebrais por citometria de fluxo para comparar com os resultados obtidos no baço e, também, a complementação da análise histopatológica através de avaliação da apoptose tanto no cérebro, quanto na medula.

Apesar da complexidade da EM e das dificuldades do seu tratamento, os resultados deste estudo sugerem que o 17 β -Estradiol possa ser uma terapia preventiva para esta doença, atuando principalmente através do aumento de IL-10 e diminuição de IFN- γ , TNF- α e IL-17. Além disso, o conhecimento dos mecanismos de imunomodulação do 17 β -Estradiol na EAE, obtidos neste estudo, pode contribuir para um melhor entendimento e futura manipulação da resposta imunológica, favorecendo pacientes com EM e outras doenças auto-imunes mediadas por células.

6 CONCLUSÃO

O tratamento com 17 β -Estradiol parece ser efetivo na melhora dos sinais e sintomas clínicos da EAE através de efeitos imunomoduladores, como diminuição do infiltrado celular e de citocinas inflamatórias e aumento de linfócitos B e da produção de IL-10.

7 REFERÊNCIAS

BALABANOV, R.; STRAND, K.; GOSWAMI, R.; MCMAHON, E.; BEGOLKA, W.; MILLER, S. D.; POPKO, B. 2007. Interferon- γ -Oligodendrocyte Interactions in the regulation of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **The Journal of Neuroscience**, **27 (8)**: 2013-2024.

BARNES, P. J. 2006. How corticosteroids control inflammation. **British Journal of Pharmacology**, **148**: 245-254.

BEBO JUNIOR, B. F.; FYFE-JOHNSON, A.; ADLARD, K.; BEAM, A. G.; VANDENBARK, A. A.; OFFNER, H. 2001. Low-dose estrogen therapy ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in two different inbred mouse strains. **The Journal of Immunology**, **166**: 2080-2089.

BIRK, K., FORD, C.; MELTZER, S. 1990. The clinical course of multiple sclerosis during pregnancy and the puerperium. **Archives of Neurology**, **47**: 738.

BOUAZIZ, J-D.; YANABA, K.; TEDDER, T. F. 2009. Regulatory B cells as inhibitors of immune responses and inflammation. **Immunological Reviews**, **224**: 201-214.

CARSON-JURICA, M. A.; SCHRADER, W. T.; O'MALLEY, B. W. 1990. Steroid receptor family: structure and functions. **Endocrine Reviews**, **11 (2)**: 201-220.

CASTRO, S. A. F. N. **A abordagem fonoaudiológica na esclerose múltipla: Relato de caso**. 1999. 83 f. Monografia (Especialização em Motricidade Oral) - Centro de Especialização em Fonoaudiologia Clínica, Porto Alegre

CHABAUD, M.; DURAND, J. M.; BUCHS, N.; FOSSIEZ, F.; PAGE, G.; FRAPPART, L.; MIOSSEC, P. 1999. A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. **Arthritis and Rheumatism**, **42 (5)**: 963-970.

CHEN, J.; LIU, X. 2009. The role of interferon γ in regulation of CD4⁺ T-cells and its clinical implications. **Cellular Immunology**, **254**: 85-90.

DALAL, M.; KIM, S.; VOSKUHL, R.R. 1997. Testosterone therapy ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis and induces a T helper 2 bias in the autoantigen-specific T lymphocyte response. **The Journal of Immunology**, **159**: 3-6.

DE PAULA, M. L.; GOMES, N. A.; SILVA, V. S.; RIBEIRO, R. S.; DAMASCENO, C. A. A.; PIRES, L. A.; AMARAL, K. B.; TEIXEIRA, H. C.; FERREIRA, A. P. 2008. Genistein down-modulates pro-inflammatory cytokines and reverses clinical signs of experimental autoimmune encephalomyelitis. **International Immunopharmacology**, **8**: 1291-1297.

DU, S.; SANDOVAL, F.; TRINH, P.; VOSKUH, R. R. 2010. Additive effects of combination treatment with anti-inflammatory and neuroprotective agents in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Neuroimmunology**, **219 (1-2)**: 64-74.

DUBAL, D.B.; ZHU, H.; YU, J.; RAU, S. W.; SHUGHRUE, P.J.; MERCHENTHALER, I.; KINDY, M. S.; WISE, P. M. 2001. Estrogen receptor α , not β , is a critical link in estradiol-mediated protection against brain injury. **Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS**, **98 (4)**: 1952-1957.

ENCINAS, J. A.; LEES, M. B.; SOBEL, R. A.; SYMONOWICZ, C.; WEINER, H. L.; SEIDMAN, C. E.; SEIDMAN, J. G.; KUCHROO, V. K. 2001. Identification of genetic loci associated with paralysis, inflammation and weight loss in mouse experimental autoimmune encephalomyelitis. **International Immunology**, **13 (3)**: 257-264.

GIATTI, S.; D'INTINO, G.; MASCH, O.; PESARESI, M.; GARCIA-SEGURA, L-M.; CALZA, L.; CARUSO, D.; MELCANGI, R. C. 2010. Acute experimental autoimmune encephalomyelitis induces sex dimorphic changes in neuroactive steroid levels. **Neurochemistry International** **56**: 118-127.

GOLD, S. M.; VOSKUHL, R. R. 2009. Estrogen and testosterone therapies in multiple sclerosis. **Progress in Brain Research**, **175**: 239-251.

GRIGORIADIS, N.; HADJIGEORGIOU, G. H. 2006. Virus-mediated autoimmunity in multiple sclerosis. **Journal of Autoimmune Diseases**, **3**:1.

GUSTAFSSON, J-A. 1999. Estrogen receptor β - a new dimension in estrogen mechanism of action. **The Journal of Endocrinology**, **163**: 379-383.

HOFSTETTER, H. H.; TOYKA, K. V.; TARY-LEHMANN, M.; LEHMANN, P. V. 2007. Kinetics and organ distribution of IL-17-producing CD4 cells in proteolipid protein 139-151 peptide-induced experimental autoimmune encephalomyelitis of SJL/J mice. **The Journal of Immunology**, **178**: 1372-1378.

HUSEBY, E. S.; LIGGITT, D.; BRABB, T.; SCHNABEL, B.; ÖHLÉN, C.; GOVERMAN, J. 2001. A pathogenic role for myelin-specific CD8⁺ T cells in a model for multiple sclerosis. **Journal of Experimental Medicine**, **194**: 669-676.

ISSAZADEH, S.; LJUNGDAHL, A.; HIJJEGERG, B.; MUSTAFA, M.; OLSSON, T. 1995. Cytokine production in the central nervous system of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis: dynamics of mRNA expression for interleukin-10, interleukin-12, cytolytic, tumor necrosis factor alpha and tumor necrosis factor beta. **Journal of Neuroimmunology**, **61**: 205-12.

ITO, A.; BUENAFE, A. C.; MATEJUK, A.; ZAMORA, A.; SILVERMAN, M.; DWYER, J.; VANDENBARK, A. A.; OFFNER, H. 2002. Estrogen inhibits systemic T cell expression of TNF- α and recruitment of TNF- α ⁺ T cells and macrophages into the CNS of mice developing experimental encephalomyelitis. **Clinical Immunology**, **102** (3): 275-282.

IWAKURA, Y.; NAKAE, S.; SAIJO, S.; ISHIGAME, H. 2008. The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. **Immunological Reviews**, **226**: 57-79.

JI, Q.; GOVERMAN, J. 2007. Experimental autoimmune encephalomyelitis mediated by CD8⁺ T cells. **Annals of the New York Academy of Sciences**, **1103**: 157-166.

JIA, D.; O'BRIEN, C. A.; STEWART, S. A.; MANOLAGAS, S. C.; WEINSTEIN, R. S. 2006. Glucocorticoids act directly on osteoclasts to increase their life span and reduce bone density. **Endocrinology**, **147** (12): 5592-5599.

KARUSSIS, D.; TEITELBAUM, D.; SICSIC, C.; BRENNER, T.; THE AC001 MULTI-CENTER ISRAELI STUDY GROUP. 2010. Long-term treatment of multiple sclerosis with glatiramer acetate: Natural history of the subtypes of anti-glatiramer acetate antibodies and their correlation with clinical efficacy **Journal of Neuroimmunology**, **220** (1-2): 125-130.

KLEINSCHEK, M. A.; OWYANG, A. M.; JOYCE-SHAIKH, B.; LANGRISH, C. L.; CHEN, Y.; GORMAN, D. M.; BLUMENSCHNEIN, W. M.; MCCLANAHAN, T.; BROMBACHER, F.; HURST, S. D.; KASTELEIN, R. A.; CUA, D. J. 2007. IL-25 regulates Th17 function in autoimmune inflammation. **The Journal of Experimental Medicine**, **204** (1): 161-170.

KOHN, A. P.; CARPENTIER, P. A.; ANGER, H. A.; MILLER, S. D. 2002 CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and

central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. **The Journal of Immunology**, **169**: 4712-4716.

KOMIYAMA, Y.; NAKAE, S.; MATSUKI, T.; NAMBU, A.; ISHIGAME, H.; KAKUTA, S.; SUDO, K.; IWAKURA, Y. 2006. IL-17 Plays an Important Role in the Development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **The Journal of Immunology**, **177**: 566-573.

KORACH, K. S. 1994. Insights from the study of animals lacking functional estrogen receptor. **Science**, **266 (5190)**: 1524-1527.

LAMPROPOULOU, V.; HOEHLIG, K.; ROCH, T.; NEVES, P.; GÓMEZ, E. C.; SWEENIE, C. H.; HAO, Y.; FREITAS, A. A.; STEINHOFF, U.; ANDERTON, S. M.; FILLATREAU, S. 2008. TLR-Activated B Cells Suppress T Cell-Mediated Autoimmunity. **The Journal of Immunology**, **180**: 4763-4773.

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. 1998. 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**, **161**: 504-512.

LINCOLN, M. R.; RAMAGOPALANA, S. V.; CHAOA, M. J.; HERRERAA, B. M.; DELUCA, G. C.; ORTONA, S-M.; DYMENTA, D. A.; SADOVNICK, A. D.; EBERS, G. C. 2009. Epistasis among HLA-DRB1, HLA-DQA1, and HLA-DQB1 loci determines multiple sclerosis susceptibility. **Proceedings of the National Academy of Sciences – PNAS**, **106 (18)**: 7542-7547.

LUBLIN, F. D.; REINGOLD, S. C. 1996. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. **Neurology**, **46**: 907-11.

LUBLIN, F. D. 2007. The incomplete nature of multiple sclerosis relapse resolution. **Journal of the Neurological Sciences**, **256**: S14-S18.

MARKOVIC, M.; MILJKOVIC, D.; MOMCILOVIC, M.; POPADICA, D.; MILJKOVIC, Z.; SAVIC, E.; RAMICA, Z.; STOJKOVIC, M. M. 2009. Strain difference in susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis in rats correlates with Th1 and Th17-inducing cytokine profiles. **Molecular Immunology**, **47**: 141-146.

MATEJUK, A.; DWYER, J.; ZAMORA, A.,.;VANDENBARK, A. A.; OFFNER, H. 2002. Evaluation of the effects of 17 β -estradiol (17 β -E2) on gene expression in experimental autoimmune encephalomyelitis using DNA microarray. **Endocrinology**, **143**: 313-319.

MATSUSHITA, T.; FUJIMOTO, M.; HASEGAWA, M.; KOMURA, K.; TAKEHARA, K.; TEDDER, T. F.; SATO, S. 2006. Inhibitory role of CD19 in the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis by regulating cytokine response. **American Journal of Pathology**, **168 (3)**: 812-821.

MATSUSHITA, T.; YANABA, K.; BOUAZIZ, J-D.; FUJIMOTO, M.; TEDDER, T. F. 2008. Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. **The Journal of Clinical Investigation**, **118 (10)**: 3420- 3430.

MILJKOVIC, Z.; MOMCILOVIC, M.; DJORDJE, M.; MOSTARICA-STOJKOVIC, M. 2009. Methylprednisolone inhibits IFN-gamma and IL-17 expression and production by cells infiltrating central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Neuroinflammation**, **6**: 37.

MOENTER, S. M.; CHU, Z.; CHRISTIAN, C. A. 2010. Neurobiological mechanisms underlying oestradiol negative and positive feedback regulation of gonadotrophin-releasing hormone neurons. **Journal of Neuroendocrinology** **21**: 327-333.

MORALES, L. B. J.; LOO, K. K.; LIU, H-B.; PETERSON, C.; TIWARI-WOODRUFF, S.; VOSKUHL, R. R. 2006. Treatment with an Estrogen Receptor α Ligand Is Neuroprotective in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **The Journal of Neuroscience**, **26 (25)**: 6823-6833.

NEUHAUS, O.; KIESEIER, B. C.; HARTUNG, H. P. 2006. Therapeutic role of mitoxantrone in multiple sclerosis. **Pharmacology and Therapeutics**, **109**: 198-209.

NOONAN, C. W.; WILLIAMSON, D. M.; HENRY, J. P.; INDIAN, R.; LYNCH, S. G.; NEUBERGER, J. S.; SCHIFFER, R.;TROTTIER; J.; WAGNER; L.; MARRIE, R. A. 2010. The Prevalence of Multiple Sclerosis in 3 US Communities. **Preventing Chronic Disease: Public Health Research, Practice and Policy**, **7 (1)**: 1-8.

OGAWA, S.; INOUE, S.; WATANABE, T.; HIROI, H.; ORIMO, A.; HOSOI, T.; OUCHI, Y.; MURAMATSU, M. 1998. The complete primary structure of human estrogen receptor β (ER β) and its heterodimerization with ER α in vivo and in vitro. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **243**: 122-126.

POLANCZYK, M.; ZAMORA, A.; SUBRAMANIAN, S.; MATEJUK, A.; HESS, D.; BLANKENHORN, E.; TEUSCHER, C.; VANDENBARK, A. A.; OFFNER, H. 2003. The protective effect of 17 β - estradiol on experimental autoimmune encephalomyelitis is mediated through estrogen receptor- α . **American Journal of Pathology**, **163 (4)**: 1599-1605.

RIO, J.; TINTORÉ, M.; NOS, C.; TÉLLEZ, N.; GALÁN, I.; MONTALBAN, X. 2005. Interferon beta in relapsing-remitting multiple sclerosis: An eight years experience in a specialist multiple sclerosis centre. **Journal of Neurology**, **252**: 795-800.

ROTHUIZEN, L. E.; BUCLIN, T.; SPERTINI, F.; TRINCHARD, I.; MUNAFO, A.; BUCHWALDER, P-A., YTHIER, A.; BIOLLAZ, J. 1999. Influence of interferon b-1a dose frequency on PBMC cytokine secretion and biological effect markers. **Journal of Neuroimmunology** **99**: 131-141.

RUDDLE, N. H.; BERGMAN, C. M.; MCGRATH, K. M.; LINGENHELD, E. G.; GRUNNET, M. L.; PADULA, S. J.; CLARK, R. B. 1990. An antibody to lymphotoxin and tumor necrosis factor prevents transfer of experimental allergic encephalomyelitis. **Journal of Experimental Medicine**, **172**: 1193-1200.

TANUMA, N.; SHIN, T.; KOGURE, K.; MATSUMOTO, Y. 1999 Differential role of TNF- α and IFN- γ in the brain of rats with chronic relapsing autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Neuroimmunology**, **93**: 73-79.

TILBERY, C. P.; MOREIRA, M. A.; MENDES, M. F.; LANA-PEIXOTO, M. A. 2000. Recomendações quanto ao uso de drogas imunomoduladoras na esclerose múltipla. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, **58 (3-A)**: 769-776.

VIRLEY, D. J. 2005. Developing therapeutics for the treatment of multiple sclerosis. **American Society for Experimental neuroTherapeutics**, **2 (4)**: 638-649.

VOORTHUIS, J.; UITDEHAAG, B.; DE GROOT, C.; GOEDE, P.; VAN DER MEIDE, P.; DIJUKSTRA, C. 1990. Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by intraventricular administration of interferon-gamma in Lewis rats. **Clinical and Experimental Immunology**, **81**: 183-188.

WOLF, S. D.; DITTEL, B. N.; HARDARDOTTIR, F.A.; JANEWAY JUNIOR, C.A. 1996. Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice. **Journal of Experimental Medicine**, **184**: 2271-2278.

- WU, C.; WANG, S.; WANG, F.; CHEN, Q.; PENG, S.; ZHANG, Y.; QIAN, J.; JIN, J.; XU, H. 2009. Increased frequencies of T helper type 17 cells in the peripheral blood of patients with acute myeloid leukaemia. **Clinical and Experimental Immunology**, **158**: 199-204.
- XIE, L.; LI, X.; FUNESHIMA-FUJI, N.; KIMURA, H.; MATSUMOTO, Y.; ISAKA, Y.; TAKAHARA, S. 2009. Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis by curcumin treatment through inhibition of IL-17 production. **International Immunopharmacology**, **9**: 575-581.
- YANABA, K.; BOUAZIZ, J-D., HAAS, K. M., POE, J. C.; FUJIMOTO, M.; TEDDER, T. F. 2008. A regulatory B cell subset with a unique phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. **Immunity**, **28**: 639-650.
- YANG, J. **Peripheral immune response in chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL/J mice**. 2003. 84 f. Dissertation (Master Course in Neuroscience) - University of Helsinki, Finland.
- ZHOU, T.; MOUNTZ, J. D.; KIMBERLY, R. P. 2002. Immunobiology of Tumor Necrosis Factor receptor superfamily. **Immunologic Research**, **26 (1-3)**: 323-336.
- ZHOU, L.; CHONG, M. M. W.; LITTMAN, D.R. 2009. Plasticity of CD4⁺ T cell lineage differentiation. **Immunity**, **30 (5)**: 646-655.