

EVILIN NANAME KOMEGAE

**Efeito imunomodulatório do *Tnp*,
um peptídeo isolado do veneno de *Thalassophryne nattereri*
na encefalomielite autoimune experimental**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Imunologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em Ciências

São Paulo
2013

EVILIN NANAME KOMEAE

**Efeito imunomodulatório do *Tnp*,
um peptídeo isolado do veneno de *Thalassophryne nattereri*
na encefalomielite autoimune experimental**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de
Doutor em Ciências

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Dra. Carla Lima da Silva

Co-Orientadora: Dra. Mônica Lopes-Ferreira

Versão original

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Komegae, Evilin Naname.

Efeito imunomodulatório no Tnp, um peptídeo isolado do veneno de *Thalassophryne nattereri* na encefalomielite autoimune experimental / Evilin Naname Komegae. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Carla Lima da Silva.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Veneno de peixe ou toxinas como ferramentas de intervenção no sistema imunológico.

Versão do título para o inglês: Immunomodulatory effect of the Tnp, a peptide isolated from the venom *Thalassophryne nattereri* on experimental autoimmune encephalomyelitis.

1. EAE 2. Doença automine 3. Tnp 4. Peptídeos cíclicos 5. Veneno de *Thalassophryne nattereri* 6. Imunomodulação I. Silva, Profa. Dra. Carla Lima da II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB0163/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Evilin Naname Komegae.

Título da Tese: Efeito imunomodulatório no Tnp, um peptídeo isolado do veneno de *Thalassophryne nattereri* na encefalomielite autoimune experimental.

Orientador(a): Profa. Dra. Carla Lima da Silva.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

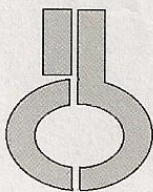
Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **74** nas fls. **89** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Carla Lima, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Efeito antiinflamatório das natterinas e do peptídeo Tnp, isolados do veneno de Thalassophryne nattereri, em um modelo de encefalomielite autoimune experimental** do qual participam o(s) alunos **Evilin Naname Komegae e a pesquisadora Monica Lopes Ferreira**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)* em **31.08.2010, com validade de 3 anos.**

São Paulo, 31 de agosto de 2010.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEUA - ICB/USP



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeito antiinflamatório das Natterinas, toxinas isoladas do veneno de *Thalassophryne nattereri*, em um modelo de encefalomielite autoimune experimental" **protocolo nº 747/10**, sob a responsabilidade de Carla Lima da Silva e Evilin Naname_Komegae, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 12/08/2010.

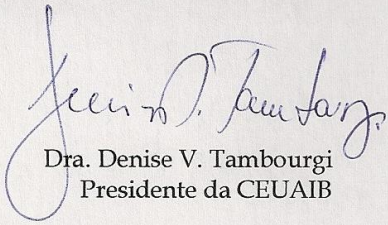
We certify that the research entitled "Anti-inflammatory effect of Natterins, toxins isolated from *Thalassophryne nattereri* venom in a model of experimental autoimmune encephalomyelitis", **protocol nº 747/10**, under the responsibility of Carla Lima da Silva and Evilin Naname_Komegae, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 08/12/2010.

Vigência do Projeto:	Nº de animais/espécie
08/2010 - 08/2014 Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada	324 camundongos C57BL/6

São Paulo, 13 agosto de 2010.

De acordo:


Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan


Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

Este trabalho contou com o Apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP): 2010/51.130-3 e 2012/50.001-0

Dedico esta tese a todos pacientes com Esclerose Múltipla e realmente espero que este trabalho de alguma forma contribua para o alcance na melhora da qualidade de vida deles...

*“Sou portadora de Esclerose Múltipla, há 9 anos diagnosticada.
No trabalho sentia tonturas e dores de cabeça, em questão de dias dificuldades para andar...
Tive um surto muito forte que me deixou numa cama por meses, sem ao menos conseguir me sentar...
Certo que isso me abalou, mas não deixei o desespero tomar conta de mim...
Tomo os medicamentos... e não sinto melhoras ...
Sem levar em consideração os terríveis efeitos colaterais, piores do que a própria doença...
Estou a anos vivendo no escuro, tentando o tratamento porque não tenho outra opção e
não quero desistir da minha vida, afinal a teimosia é uma virtude!!!”
(Depoimento de uma portadora de Esclerose Múltipla)*

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Dra. **Carla Lima**. Obrigada por acreditar em mim quando eu achei difícil acreditar em mim mesma. Obrigada por dizer, algumas vezes, o que eu realmente precisava ouvir em vez do que eu queria que você dissesse, e por ter me mostrado sempre outro lado a considerar. Obrigada por colocar tanta sabedoria, cuidado e dedicação neste trabalho. Obrigada por sempre ser honesta comigo, ser gentil e sempre presente quando necessito. Obrigada por toda minha formação, não apenas profissional. Pois a base de toda conquista depende de um bom condutor. Um sincero obrigada por tudo!!!

A minha co-orientadora Dra. **Mônica Lopes Ferreira**. Existem pessoas que tornam nossa caminhada mais significativa...pela companhia...pelo apoio...pelo carinho...pela dedicação...pela cumplicidade...e porque nos torna melhores...Tenha certeza de que você é uma destas pessoas em minha vida!!! Obrigada por me acolher todos esses anos me mostrando sempre o melhor caminho a seguir... Você é muito especial!!!

Ao meu filho **Benício Bolsonaro** e ao meu marido **Rodrigo Bolsonaro**. Às vezes nos perguntamos qual a razão para nos sentirmos completos ou pra tamanha felicidade... Até pouco tempo eu não sabia... Mas foi prestando atenção nos acontecimentos que pude perceber... Que a felicidade se fez a partir do momento que passei a olhar a vida de outro ângulo... Que passei a olhar a vida como Mãe e esposa... por ver meu mundo se encher de luz simplesmente porque vocês sorriem pra mim... e por sentir minhas energias serem recarregadas com um abraço de vocês.... E vi com tudo isso que a vida é simples assim... que mais uma vez ficou provado que a palavra "amor" é simples de se escrever...mas muito poderosa de se sentir... Obrigada por vocês me completarem... Amo vocês!!!

A minha mãe **Maricleia Komegae** e a minha irmã **Karina Komegae**, que mesmo estando longe sempre estão tão perto... tão presentes... Agradeço por esta base familiar tão íntegra que me permite almejar sonhos e possibilidades para ir em busca destes sonhos...bem como coragem para enfrentar todos os obstáculos...otimismo para não desistir...e risadas para descontraír... Vocês são minha fortaleza... Amo vocês...

A toda minha família, que sempre torce e vibra com cada conquista alcançada. Em especial a minha avó **Ivanir Persuhn** que não mediu esforços para que eu alcançasse meus objetivos.

A **Lidiane Grund**. Às vezes na vida, você encontra uma amiga especial, que transforma sua vida simplesmente. Alguém que faz você rir... Alguém que faz você acreditar em coisas boas... Alguém que convence você de que existe uma porta destrancada só esperando para que você abra. Esta é a Amizade para Sempre. Quando você está deprimida... E o mundo parece escuro e vazio, sua amiga para sempre anima seu espírito, fazendo com que aquele mundo escuro e vazio de repente pareça iluminado e preenchido. Uma amiga para sempre fica ao seu lado... Principalmente nas horas que você está confusa. Uma amiga para sempre a guiará e a animará. Te considero uma dessas amigas... Uma amiga para sempre...e para sempre não tem fim...Viu!!! Obrigada por você existir!!!

Ao **Márcio Ferreira**, um amigo que aos poucos foi me conquistando... E amizade verdadeira é assim, não precisa ser imediata apenas tem que ser pra valer...Tenho a certeza de que posso contar com você, bem como a recíproca é verdadeira...Obrigada!!!

A todos os amigos do laboratório de Imunoregulação...Fernanda Bruni, Anderson Ramos, Fernanda Arantes, Edson Ishizuka e Érica Coutinho que já se foram um muito obrigada, tenha a certeza que vocês fazem parte da minha vida!!!... e as alunas novas Carol, Vanessa e Jéssica uma Boa sorte nesta nova jornada....

A todos do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada em especial a Leda, a Maria José e Cida e a todos do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas em especial a Eni...

Ao Dr. **Alexandre Steiner**, ao Dr. **Alexandre Basso** e ao Dr. **Cristóforo Scavone**, integrantes da Banca de Qualificação, pelas valiosas sugestões...

A **Fapesp** pelo apoio financeiro...

*Chorar não resolve, falar pouco é uma virtude e o que não mata com certeza fortalece.
Às vezes mudar é preciso, nem tudo vai ser como queremos, a vida continua. Pra qualquer escolha se segue
alguma consequência, vontades efêmeras não valem a pena, quem faz uma vez não faz duas necessariamente,
mas quem faz dez, com certeza faz onze.
Perdoar é nobre, esquecer é quase impossível. Nem todo mundo é tão legal assim, e de perto ninguém é normal.
Quem te merece não te faz chorar, quem gosta cuida, o que está no passado tem motivos para não fazer parte do
seu presente, não é preciso perder pra aprender a dar valor e os amigos ainda se contam nos dedos.
Aos poucos você percebe o que vale a pena, o que se deve guardar para o resto da vida, e o que nunca deveria ter
entrado nela. Não tem como esconder a verdade, nem tem como enterrar o passado, o tempo sempre vai ser o
melhor remédio, mas seus resultados nem sempre são imediatos.*

(Charles Chaplin)

RESUMO

KOMEGAE, E. N. **Efeito imunomodulatório do *Tnp*, um peptídeo isolado do veneno de *Thalassophryne nattereri* na encefalomielite autoimune experimental.** 2013. 86 f. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Diante da ausência de tratamentos eficazes para a esclerose múltipla (EM) e sabendo que peptídeos derivados de venenos animais têm sido usados como protótipos farmacológicos para o desenvolvimento de novas drogas avaliamos o efeito do *Tnp*, um peptídeo cíclico inédito e com potencial antiinflamatório derivado do veneno do peixe peçonhento *Thalassophryne nattereri*, na encefalomielite autoimune experimental (EAE), um modelo representativo da EM. Avaliamos também a participação da citocina IL-10 na modulação dos efeitos do *Tnp*. Para isto, induzimos a EAE ativamente em camundongos C57BL/6 fêmeas *WT* ou IL-10 *KO* pela imunização com o MOG₃₅₋₅₅, um peptídeo imunodominante da mielina. Demonstramos que a aplicação subcutânea do *Tnp* (3 mg/Kg) em vários esquemas de tratamento: profilático (0-9 dias), terapêutico (10-19 dias) ou contínuo (0-19 dias) consegue diminuir a intensidade dos sintomas clínicos e adiar o pico de aparecimento dos sintomas graves por mecanismos também dependentes de IL-10. O uso de histologia, zimografia e citometria de fluxo, nos permitiu observar que o *Tnp* beneficemente interfere no circuito imunológico da EAE em vários estágios: 1) suprime o estado de ativação das células dendríticas convencionais (cDC) e propicia a emergência de DC plasmocitóides durante a fase de indução da EAE; 2) bloqueia o trânsito e a infiltração de leucócitos para o SNC pela inibição de integrinas e MMP; 3) bloqueia a reativação e a permanência de clones Th1 e Th17 patogênicos no SNC; 4) impede a expansão de células da microglia e o infiltrado de macrófagos no SNC; 5) favorece o aumento de células reguladoras (Treg e Breg) e ainda 6) difunde-se sistemicamente e ultrapassa a BHE e alcançar o órgão alvo. O resultado dos efeitos conjuntos do *Tnp* é a atenuação da neuroinflamação e a prevenção da desmielinização, refletindo assim na melhoria dos sinais clínicos na EAE. Em conclusão, o tratamento com o *Tnp*, não apenas apresenta efeitos supressores no curso da EAE, mas também apresenta propriedades preventivas, uma vez que tal composto atrasa significativamente o início da doença.

Apoio: FAPESP e CNPq.

Palavras-chave: EAE. Doença Autoimune. *Tnp*. Peptídeos Cíclicos. Veneno de *Thalassophryne nattereri*. Imunomodulação.

ABSTRACT

KOMEGAE, E. N. **Immunomodulatory effect of the *Tnp*, a peptide isolated from the venom *Thalassophryne nattereri* on experimental autoimmune encephalomyelitis.** 2013. 86 p. Ph. D. thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Given the lack of effective treatments for multiple sclerosis (MS) and knowing that peptides from venomous have been extensively used as pharmacological prototype for the development of new drugs here we evaluated the effect of the *Tnp*, a described antiinflammatory cyclic peptide identified in the venom of *Thalassophryne nattereri* Brazilian fish, on experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), a representative model of MS. As well, we evaluated whether IL-10 is required for the suppressive mechanisms of the *Tnp*. In female C57BL/6 *WT* and IL-10 *KO* mouse model of EAE induced by sensitization to MOG₃₅₋₅₅ peptide, we found that prophylactic (0-9 days), therapeutic (10-19 days) or continuous (0-19 days) s.c. injections of *Tnp* (3 mg/kg/day) significantly reduced the clinical severity of EAE. The analyses by histology, zymography or flow cytometry allowed us to observe that modulation of EAE by *Tnp* was related with: 1) suppression of the activation state of conventional dendritic cells (DC) and the emergence of plasmacytoid DC during the induction phase of EAE; 2) blocking the traffic and leukocyte infiltration in the central nervous system (CNS) by suppression of metalloproteinases (MMP-9) activity and synthesis; 3) blocking of the reactivation and retention of Th1 and Th17 pathogenic clones in the CNS; 4) prevention the growth of microglia cells and the infiltrate of macrophages in the CNS; 5) increasing of regulatory cells (Treg and Breg) in the secondary lymphoid organs and in the CNS, and also 6) *Tnp* can overcome the blood-brain barrier and reach the target organ. In conclusion, *Tnp* can reduce the severity of symptoms and delay the peak of onset of severe symptoms by mechanisms dependent on IL-10. These results shed light on the role of *Tnp* a small molecule in the regulation of inflammation and provides a new therapeutic opportunity for the treatment of MS.

Support by: Fapesp and CNPq.

Keywords: EAE. Autoimmune Disease. Cyclic peptide. *Thalassophryne nattereri* Venom. Immunomodulator.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVO	23
3 ETAPAS REALIZADAS.....	24
4 MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 Animais	26
4.2 Obtenção do MOG ₃₅₋₅₅	26
4.3 Obtenção do Tnp	26
4.4 Indução da EAE em camundongos	27
4.5 Tratamento com Tnp	27
4.6 Obtenção de células esplênicas	28
4.7 Obtenção de células do cérebro e do cordão espinhal	28
4.8 Histologia do cordão espinhal	28
4.9 Zimografia para avaliação da atividade proteolítica de MMP	29
4.10 Análise fenotípica das células por citometria de fluxo	29
4.11 Avaliação de DC e de linfócitos T CD4 ^{POS}	30
4.12 Avaliação de células da microglia e de macrófagos no SNC	30
4.13 Avaliação da indução de células T e B reguladoras e células Th2	30
4.14 Acoplamento Tnp-FITC e injeção de Tnp-FITC	31
4.15 Análise estatística	31
5 RESULTADOS	32
5.1 Obtenção do MOG ₃₅₋₅₅ para indução do modelo de EAE	32
5.2 Indução de EAE e esquema terapêutico com o Tnp	35
5.3 O tratamento com o Tnp melhora e adia os sinais clínicos da EAE parcialmente dependente de IL-10	37
5.4 O Tnp é capaz de suprimir a ativação de cDC nos órgãos linfoides secundários dependente de IL-10	41
5.5 O Tnp via IL-10 suprime a população de linfócitos T CD4 ^{POS} durante a fase de indução da EAE	44
5.6 O Tnp via IL-10 induz células reguladoras nos órgãos linfoides secundários	46
5.7 O Tnp controla o infiltrado celular e a desmielinização no SNC independente de IL-10 no pico da doença	48
5.8 A diminuição da atividade de MMP-9 induzida pelo tratamento com o Tnp profilático depende de IL-10	53
5.9 O tratamento com o Tnp modula o estado de ativação dos linfócitos T CD4 ^{POS} no SNC parcialmente via IL-10	55
5.10 A diminuição de linfócitos Th1 induzida pelo Tnp independe de IL-10 enquanto a diminuição de Th17 no SNC é parcialmente dependente	57
5.11 O Tnp gera linfócitos T reguladores no SNC dependente de IL-10	59
5.12 O Tnp impede a expansão de células da microglia e inibe o infiltrado de macrófagos no SNC	61
5.13 O Tnp é difundido, ultrapassa a BHE e alcança a substância cinzenta do SNC	64
6 DISCUSSÃO	70
7 CONCLUSÃO	76

1 INTRODUÇÃO

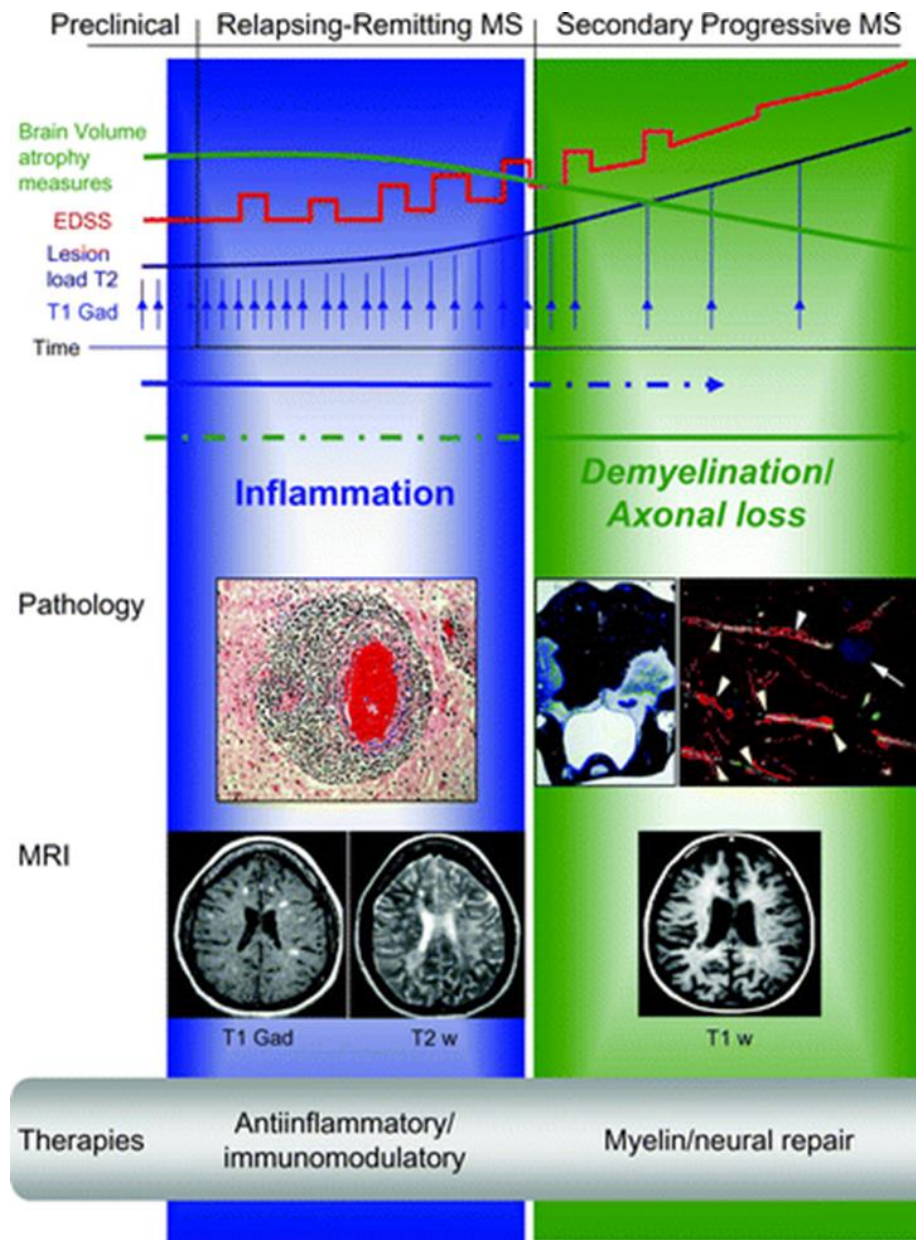
A Esclerose Múltipla (EM) é uma das doenças mais comuns do sistema nervoso central (SNC) caracterizada por desmielinização e disfunção neurológica progressiva (RUNIA et al., 2012). A EM tem sido cada vez mais estudada, tanto na pesquisa básica como na clínica por ser uma doença debilitante, altamente complexa e pela elevada incidência. Atualmente, de acordo com a Federação Internacional de Esclerose Múltipla estima-se 2.1 milhões de pessoas com esclerose múltipla no mundo (<http://www.msif.org/pt/>). No Brasil, sua taxa de prevalência é de aproximadamente 10 casos para cada 100.000 habitantes de acordo com o Ministério da Saúde (http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/pcdt_esclerose_multipla.pdf).

A real etiologia da EM ainda é desconhecida, mas muitos estudos indicam a importância do sistema imune na patogênese da doença, influenciada por ambos os fatores genéticos e ambientais (MCELROY; OKSENBERG, 2008). Estudos genéticos e familiares revelam que os alelos HLA-DR1501 e HLA-DQ0601 estão associados com 2 a 4 vezes mais risco de desenvolvimento da EM (EBERS et al., 1995; OLERUP; HILLERT, 1991; SADOVNICK et al., 1996), além da alta prevalência em algumas etnias (particularmente em pessoas do Norte Europeu) (CORADDU, 1998). No entanto, a associação entre as recaídas e infecções virais apoia fortemente o papel de fatores ambientais no desenvolvimento da EM (ADAM et al., 2010; BULJEVAC et al., 2002).

A doença geralmente começa na idade adulta e afeta principalmente as mulheres. Afeta usualmente adultos na faixa de 18 a 55 anos, mas casos fora destes limites têm ocorrido. Os sinais clínicos variam muito e apesar de cada indivíduo apresentar uma combinação diferente de sintomas que incluem ataxia, perda da coordenação motora, hiperreflexia, fadiga, dificuldades cognitivas e de visão, há certos padrões distintos de sintomas que permitem classificações durante a evolução da doença. O diagnóstico é baseado nos Critérios revisados por McDonald (POLMAN et al., 2005), sendo o diagnóstico diferencial bastante amplo e complexo. Estes critérios são os adotados pela comunidade científica mundial para o diagnóstico de esclerose múltipla e a ressonância magnética (RM) do encéfalo demonstrará lesões características de desmielinização (apenas 1 ou 2 lesões sugestivas de EM na RM). Devem ser realizados alguns exames laboratoriais (exames de anti-HIV e VDRL e dosagem sérica de vitamina B12) no sentido de excluir outras doenças de apresentação semelhante à EM. Deficiência de vitamina B12, neurolesões ou infecção pelo HIV (o vírus HIV pode causar uma encefalopatia com imagens à RM semelhantes às que ocorrem na EM) apresentam quadros radiológicos semelhantes aos de EM, em alguns casos.

De acordo com o Ministério da Saúde, no Brasil há quatro formas de evolução clínica na esclerose múltipla: remitente-recorrente (EM-RR) caracterizada por períodos claramente definidos de comprometimento das função neurológica (surto), seguida por períodos de recuperação parcial ou completa (remissões), primariamente progressiva (EM-PP), primariamente progressiva com surto (EM-PP com surto) e secundariamente progressiva (EM-SP). A forma mais comum é a EM-RR, representando 85% de todos os casos no início de sua apresentação. A forma EM-SP é uma evolução natural da forma EM-RR em 50% dos casos após 10 anos do diagnóstico (em casos sem tratamento – história natural). As formas EM-PP e EM-PP com surto perfazem 10% a 15 % de todos os casos (http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/pcdt_esclerose_multipla.pdf).

Figura 1 - Representação esquemática da evolução clínica da EM.



A escala clínica da EM é indicada pela *linha vermelha*. A frequência de eventos inflamatórios é indicada pelas *setas azuis*; o dano tecidual pela *linha azul* e atrofia cerebral pela *linha verde*. Alterações patológicas podem ser observadas na foto à esquerda, onde há uma intensa inflamação perivascular de células mononucleares. À direita, observamos áreas de desmielinização (em azul e branco) e perda de mielina nas conexões axonais (*em verde*). Por Imagem de ressonância magnética: Em T1-Gad (contraste), as lesões brancas indicam áreas de inflamação recente e ruptura da barreira hemato-encefálica (BHE). Em T2 observamos em branco os ventrículos cheio de fluídos cérebro espinhal e lesões no parênquima cerebral. Em T1w observamos uma atrofia cerebral, com ventrículos laterais largos e sulcos corticais.

Fonte: Adaptado de Sospedra e Martin (2005).

O papel do sistema imunológico na patogênese da EM foi proposto desde as observações iniciais de desmielinização aguda em humanos após a imunização acidental com componentes da mielina (por exemplo, após a vacinação contra o vírus da raiva que eram cultivados sobre oligodendrócitos) (REMLINGER, 1928) os quais apresentavam paralisias semelhantes à EM e desde então, vários grupos têm demonstrado e comprovado a importância dos componentes do sistema imune na patogenia da EM (HAFLER et al., 2005; HEMMER et al., 2002; MILLER, 2012; ZHANG et al., 1992). A EM é autoimune, degenerativa e dependente de diferentes clones auto-reativos de linfócitos T CD8 positivos, restritos à molécula MHC de classe I que reconhecem diversos epítomos de mielina, presentes na circulação e no fluido cérebro-espinhal. Observa-se também infiltrado de macrófagos da circulação e infiltração tardia de linfócitos T CD4 positivos e linfócitos B produtores de anticorpos com formação de centro germinativo na região submeningeal. Ainda ocorre a formação de agregados de células inflamatórias semelhantes a folículos linfóides nas meninges e no espaço perivascular.

O modelo animal de EM denominado encefalomielite autoimune experimental (EAE) foi estabelecido há 80 anos por Rivers e colaboradores (RIVERS et al., 1933). Devido à inacessibilidade do SNC dos pacientes e a similaridade do modelo quanto à patogênese de autoimunidade, inflamação do SNC, desmielinização e sintomas (BAXTER, 2007; SOSPEDRA; MARTIN, 2005), atualmente o modelo de EAE é responsável por cerca de 9.300 trabalhos publicados no *PubMed* e vem se mostrando importante para o estudo de diversas substâncias antiinflamatórias permitindo a translação dos resultados para humanos (ELLOSO et al., 2005; GREENWOOD et al., 2006; THEIL et al., 2009). A EAE é mais comumente induzida em camundongos, mas pode também ser induzida em outras espécies como ratos, coelhos e macacos. A indução ativa em animais susceptíveis pela imunização com antígenos derivados da mielina adsorvidos em adjuvante é a forma mais comum, entretanto a indução passiva pela transferência adotiva de linfócitos T CD4^{POS} reativas à mielina também vem sendo amplamente utilizada (BAXTER, 2007).

Na EAE induzida ativamente, após a quebra da tolerância imune, o ataque do SNC por células imunes pode ser dividido em 2 fases: a **Fase indutora**, que ocorre nos órgãos linfóides secundários (entre os dias 0 a 9), onde as células apresentadoras de antígenos (APC) em pleno estado de maturação (expressão elevada das moléculas de MHC de classe II, CD40, CD80 e CD86) levam os epítomos de mielina e ativam os linfócitos T CD4^{POS}, que sofrem expansão clonal e diferenciação em clones Th1 produtores de IFN- γ (KUCHROO et al., 2002) e clones Th17 secretores de IL-17A, IL-17F e IL-21 (HARRINGTON et al., 2005). A segunda fase da doença denominada **Fase efetora** (entre os dias 10 a 19, com pico no 17) se inicia quando os linfócitos T auto-reativos saem dos órgãos linfóides, atravessam a barreira hematoencefálica (BHE) e migram para o parênquima e o espaço perivascular

do SNC, seguido pelo influxo de macrófagos, mecanismos estes dependentes de moléculas de adesão (ARCHELOS et al., 1999; ENGELHARDT et al., 1998 e 2003), quimiocinas (HUANG et al., 2001) e metaloproteinases de matriz (MMP - HU et al., 2007; PAGE-MCCAW et al., 2007).

Dentro do SNC, os linfócitos T são reativados por células residentes (astrócitos e microglia) e por células dendríticas (DC) e macrófagos infiltrantes, amplificando a liberação de mediadores inflamatórios como prostaglandinas, radicais livres, intermediários reativos de oxigênio, óxido nítrico, MMP e citocinas inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e TNF- α (BENVENISTE, 1997; DITTEL et al., 2008). Esta neuroinflamação, bem como a ativação de células T citotóxicas resulta na perda da mielina e, conseqüentemente, na degeneração axonal e morte neuronal que refletem em paralisia, típica dos sintomas da EM.

No curso da resposta inflamatória da EAE vem sendo descrita a geração de várias proteases intracelulares ou extracelulares. As proteases são cruciais para a regulação de mecanismos imunológicos, tais como apresentação de antígeno, a migração de células imunitárias e inflamatórias e de ativação (PUENTE et al., 2003). A família de proteases é dividida em quatro sub-categorias principais baseado na interação do resíduo catalítico das proteases com inibidores específicos: a) serino-proteases, b) metaloproteases, c) proteases aspárticas e d) cisteíno-proteases. Neste sentido, o uso de inibidores de proteases têm sido promissor na terapêutica da EM (DAI et al., 2012).

Embora a indução da EM inclua condições para a quebra da tolerância a antígenos próprios, o sistema imune lança mão de inúmeros mecanismos para evitar que fenômenos autoimunes aconteçam e que resultem em efeitos deletérios para o organismo. Neste sentido, o favorecimento da geração e manutenção de algumas células e citocinas se destacam, dentre elas: as DC plasmocitóides (pDC) (ISAKSSON, et al., 2009; PENA-CRUZ et al., 2010), as células T reguladoras (Treg) e células B reguladoras (Breg), bem como as citocinas IL-10, TGF- β , e mais recentemente descrita a IL-35. Uma vez que defeitos nestes componentes regulatórios invariavelmente resultam em doenças autoimunes e inflamatórias (MAHNKE et al., 2003) na EAE não é diferente, o papel das pDC (CD11c^{low}B220^{pos}Gr-1^{pos}PDL-1^{pos}PDL-2^{pos}) têm sido relacionado a proteção principalmente durante a fase tardia da doença (PENA-CRUZ et al., 2010). A importância das células Treg (CD4^{pos}CD25^{pos}FoxP3^{pos}) na EM tem sido confirmada, uma vez que defeitos neste subtipo celular podem ser uma das causas do desenvolvimento da autoimunidade. Ademais, existe uma correlação positiva entre a presença de IL-10 produzida por células Treg no SNC e a recuperação da doença (MCGEACHY et al., 2005), bem como a expressão de CTLA-4 (SAKAGUCHI et al., 2006). Células Breg (CD19^{pos}CD5^{pos}CD1d^{pos}) produtoras de IL-10, também estão relacionadas ao controle da EAE, uma vez que a transferência adotiva destas células atenua a doença. Recentes dados mostram que a depleção transiente de células B influencia potencialmente a indução, manutenção e reativação de linfócitos T

CD4^{pos} (LUND; RANDALL, 2010) além de também terem sido relatadas facilitar o recrutamento de células Treg para o SNC durante a fase crônica da EAE (MANN et al., 2007), mostrando assim o papel duplo que os linfócitos B desempenham na EAE.

O papel das citocinas como importantes elementos regulatórios nos processos imunes está bem estabelecido (ENG et al., 1996). A IL-10 foi primeiramente descrita como um fator produzido por células Th2, com papel na inibição da síntese de citocinas pelas células Th1 (FIORENTINO et al., 1991) por interferir na apresentação antigênica mediado pelas APC (DE WAAL MALEFYT et al., 1991). Atualmente, sabe-se que a IL-10 é secretada por diversos tipos celulares (Th1, Breg, Treg, DC, macrófagos, células endoteliais) e que sua ação também é ampla, uma vez que inúmeras células expressam os receptores IL-10R1 e IL-10R2.

A IL-10, portanto é uma das principais citocinas reguladoras e juntamente com o TGF- β e a IL-35 apresentam papéis essenciais na prevenção e no controle de doenças autoimunes (BETTELLI et al., 1998; BELKAID; CHEN, 2010; CHEN et al., 2009; COLLISON et al., 2010). As ações supressoras destas citocinas têm sido extensivamente estudadas em modelos animais que superexpressam ou que são deficientes destas citocinas, e os resultados mostram que a superexpressão de IL-10, por exemplo, é protetora no desenvolvimento da EAE, bem como os animais IL-10 *Knockout* (KO) apresentam uma doença exacerbada (BETTELLI et al., 1998; KENNEDY et al., 1992; SAMOILOVA et al., 1998). Similarmente, uma menor produção de IL-10 em humanos é relacionada como um fator de risco para o desenvolvimento e para a patogênese da EM (VANDENBARK et al., 2001). Sendo assim, a IL-10 tem um importante papel na supressão da doença em camundongos e em humanos.

Ao longo dos últimos anos, vários agentes terapêuticos para o tratamento da EM têm sido testados e estudados, mas a gestão da doença ainda permanece complexa e pouco confiável. Quanto à falha terapêutica, considera-se esta como sendo dois ou mais surtos num período de 12 meses, de caráter moderado ou grave com sequelas ou limitações significantes, pouco responsivos à pulsoterapia.

Com base na natureza inflamatória da doença, a imunossupressão global foi a primeira abordagem para a atenuação dos efeitos das células imunes auto-reativas no SNC. Em alguns estudos iniciais, o tratamento com a *Ciclosporina* (um polipeptídeo cíclico que contém 11 aminoácidos) demonstrou alguns efeitos secundários benéficos na EM. Além disso, a *Mitoxantrona* - Novantrone (pertencente à família das antracenedionas sintéticas) também tem sido utilizada para o tratamento das formas mais graves da doença, corroborando assim para o atraso na progressão da incapacidade de alguns pacientes com EM (HARTUNG et al., 2002).

O tratamento preconizado pelo Ministério da Saúde no Brasil é apenas para as formas recorrentes-remittente e secundariamente progressiva, pois não há evidências de benefício para as demais. O tratamento inicial deve ser feito com uma das opções dentre o *Acetato de glatiramer* (de 7.000 Da, GA) e as drogas recombinantes derivadas do *Interferon-β* (IFN-β1a e IFN-β1b - Avonex e Rebif de 22.000 Da, Betaferon de 18.000 Da) que são igualmente eficazes no controle das recidivas, mesmo que apresentem um efeito modesto na redução dos surtos (em torno de 30%) e no retardo de deficiências na remissão dos pacientes (JACOBS et al., 1996; JOHNSON et al., 1995).

Os mecanismos sugeridos para o IFN-β no controle da EM são: limitação do tráfico de células T para o SNC, a restauração do balanço Th1-Th2 pela indução da produção de IL-10, e a indução de propriedades antivirais (YONG, 2002). Vale ressaltar que a maioria das drogas utilizadas na clínica para o tratamento da EM, inclusive os da classe de *Interferons-β* que representa a principal droga, requer a participação da citocina IL-10 para mediação do controle da evolução da doença (Ersoy et al., 2005).

Por outro lado, o mecanismo inibitório do GA parece ser causado pela geração de células Th2 reativas à mielina que atravessam a BHE e suprimem as lesões no SNC pela alteração no padrão de citocinas (NEUHAUS et al., 2001). No entanto, nenhum estudo foi capaz de demonstrar um benefício significativo na supressão da progressão da doença, pois nem todos os pacientes respondem ao IFN-β e um número substancial de pacientes que inicialmente respondem acaba apresentando uma redução na eficácia do tratamento durante o curso da doença. Isto tem sido atribuído à geração de uma resposta de anticorpos neutralizantes contra o IFN-β (HEMMER et al., 2005).

Diante destes dados que mostram a baixa eficácia no controle das recidivas da EM modesta redução dos surtos (em torno de 30%), fica claro a existência de uma grande oportunidade de pesquisas inovadoras nesta área. Neste sentido, novos compostos imunomoduladores que melhoram a EAE têm se mostrado uma promessa para o tratamento da EM. As *Estatinas* e a *Minociclina* que exercem uma variedade de ações imunomoduladoras foram avaliadas em testes pré-clínicos e clínicos (METZ et al., 2004; VOLLMER et al., 2004). Terapia com células-tronco hematopoiéticas para formação de um novo repertório de células T também produziu resultados promissores, porem acompanhados de elevada mortalidade (BURT et al., 2005).

A deleção específica de populações celulares distintas, o bloqueio seletivo ou a ativação de células e moléculas reguladoras têm também sido de grande interesse para o tratamento da EM. Anticorpos monoclonais têm sido amplamente utilizados contra moléculas de superfície de células específicas. A depleção de linfócitos T CD4^{pos} mostrou resultados promissores em modelos animais, mas não teve nenhum impacto na EM (VAN OOSTEN et al., 1996). Por outro lado, a depleção de

células B pelo uso de anti-CD20 parece ser benéfica em grupos de pacientes com atividade humoral exacerbada (STUVE et al., 2005).

Com base nos resultados positivos em EAE, anticorpos contra o fator de crescimento IL-2 para células T e terapias com anti-TNF- α foram testados em ensaios de fase II, mas também não mostraram efeito promissor em pacientes com EM (BIELEKOVA et al., 2004). Além disso, vários tratamentos têm sido desenvolvidos especificamente para linfócitos T reativos à mielina. Estas estratégias incluem a tolerização de células T auto-reativas por administração oral de antígenos de mielina ou pela administração de peptídeos da mielina alterados. Apesar dos resultados promissores em modelos experimentais, os testes clínicos já em fase III falharam (HOHLFELD; WIENDL, 2001). O bloqueio de moléculas de adesão com a utilização de anticorpos contra a integrina β 4, a fim de evitar que as células imunes atravessem a BHE também mostrou resultados positivos na EAE. Este tratamento (anti-VLA-4, *Natalizumab*) suprime eficazmente a progressão da doença em humanos, porém apresenta muitos efeitos colaterais (ADELMAN et al., 2005). O *Fingolimod*, um composto derivado da miriocina (ISP-1) um metabólito do fungo *Isaria sinclairii*, aprovado pelo FDA em 2010 para o tratamento da EM surto/remissiva apresenta mecanismos supressivos na migração de células imunes via ação em receptores esfingosina-1 fosfato, entretanto em abril de 2012 seu uso foi revisto pela elevada incidência de problemas cardíacos e sua indicação ficou restrita a acompanhamento dos efeitos da aplicação em unidade hospitalar durante a aplicação da primeira dose.

Apesar do número crescente de abordagens terapêuticas disponíveis, fica claro que nenhuma das terapias existentes consegue interromper eficazmente a progressão da doença em pacientes com EM. Portanto, existe uma grande abertura para a continuada busca de terapias mais eficazes, novas alternativas e novos compostos. Baseado no fato de que toxinas e peptídeos isolados de venenos animais têm sido cada vez mais usados como ferramentas farmacológicas e como protótipos para o desenvolvimento de novas drogas em diferentes modelos experimentais de doenças (KALMAN et al., 1998; LEWIS; GARCIA, 2003; SUAREZ-KURTZ et al., 1999) o nosso grupo coordenado pela Dra. Mônica Lopes Ferreira e pela Dra. Carla Lima em associação com o Laboratório Farmacêutico Cristália identificou e patenteou (INPI0602885-3, EP2046815, US8304382, MX300187) um peptídeo inédito com potencial antiinflamatório denominado *Tnp*, derivado do veneno do peixe peçonhento *Thalassophryne nattereri*. Este peptídeo, compreende uma sequência de 13 L-aminoácidos em sua estrutura primária, apresentando uma ponte dissulfeto, formando um peptídeo cíclico. O *Tnp* não possui efeito citotóxico em macrófagos murinos, bem como também não possui efeito danoso sobre fibras musculares ou na microcirculação do músculo cremaster de camundongos, além de não ser imunogênicos induzindo a produção de anticorpos específicos. O peptídeo *Tnp* apresenta capacidade de inibir a adesão e o rolamento dos leucócitos induzido pelo

agente inflamatório LPS na microcirculação de camundongos. Adicionalmente à inibição de adesão e rolamento dos leucócitos, observa-se após o tratamento com o *Tnp* a prevenção do recrutamento de leucócitos, particularmente neutrófilos e macrófagos, na cavidade peritoneal de camundongos injetados com LPS.

Interessantemente, o *Tnp* apresenta estrutura semelhante aos inibidores de serino-protease tipo Bowman-Birk (BBI) e tipo Kunitz, os quais foram primeiramente identificados em grãos de soja (ODANI; IKENAKA, 1973; PARK et al., 2007; QI et al., 2005). A família BBI compreende 71 aminoácidos e nove pontes de dissulfeto (KENNEDY et al., 1998; KENNEDY et al., 2005), enquanto a família Kunitz compreende 172 resíduos de aminoácidos e 2 pontes de dissulfeto que formam um sítio de ligação à protease inibindo-a, isto é, estes inibidores de proteases apresentam um sítio convexo que é complementar ao sítio ativo côncavo da protease (ONESTI et al., 1991). Baseado no fato de que inúmeras serino-proteases humanas como a elastase, a alfa-quimotripsina, quimase e catepsina-G são associadas com a função de células inflamatórias, e que estas proteases são sensíveis a inibição pelos inibidores BBI e/ou tipo Kunitz (LARIONOVA et al., 1993; WARE et al., 1997) atribuiu-se propriedades antiinflamatórias a estes inibidores.

A revisão sobre os mecanismos de doenças autoimunes e suas terapias sugere que é mais promissor reforçar ativamente os mecanismos fisiológicos imunomodulatórios (induzindo células e citocinas regulatórias), do que tentar excluir células auto-reativas de um repertório imune. E ainda mostra que é possível descobrir e utilizar novas drogas capazes de interferir no desencadeamento da doença autoimune na EM e prevenir o desenvolvimento da cronicidade da doença. Neste sentido, propomos o estudo dos principais efeitos imunomodulatórios do uso do peptídeo *Tnp* no controle dos sintomas e no adiamento do pico da doença utilizando um modelo murino de EAE.

2 OBJETIVO

O objetivo do nosso trabalho foi avaliar o efeito imunomodulatório do *Tnp*, um peptídeo inédito e com potencial antiinflamatório isolado do veneno de *Thalassophryne nattereri*, na EAE, um modelo representativo da esclerose múltipla. Bem como compreender se os mecanismos envolvidos na imunomodulação induzidos pelo *Tnp* estão associados à produção da citocina IL-10.

3 ETAPAS REALIZADAS (Figura 2)

✓ Indução da doença e Esquema terapêutico com o *Tnp*

- Obtenção do MOG₃₅₋₅₅ por síntese peptídica artificial, purificação por cromatografia e identificação por espectrometria de massas;
- Padronização do modelo de EAE em animais C57BL/6 *WT* e IL-10 *KO*;
- Padronização do tratamento com o *Tnp* em distintos esquemas: Profilático (0-9 dias), Terapêutico (10-19 dias) e Contínuo (0-19 dias);
- Análise diária dos sintomas clínicos por até 30 dias.

✓ Análise do efeito do *Tnp* durante a fase de indução da doença nos órgãos linfoides secundários (7 dias no Baço)

- Avaliação do estado funcional das DC: apresentação (MHC classe II), ativação (CD40, CD80 e CD86) e inibição (PDL-1 e PDL-2);
- Avaliação do estado de ativação (CD18, CD40L e CD69) de linfócitos T CD4^{pos};
- Avaliação da capacidade do *Tnp* de gerar células T e B reguladoras.

✓ Análise do efeito do *Tnp* na migração celular para o SNC (17º dia)

- Análise do infiltrado celular e do padrão de mielinização no SNC;
- Análise da atividade proteolítica da MMP-2 e MMP-9 no homogenato do cordão espinhal por zimografia.

✓ Análise do efeito do *Tnp* no SNC no pico da EAE (17º dia) ou durante a fase crônica (30º dia)

- Avaliação do estado de ativação (CD18, CD40L e CD69) e polarização de linfócitos T CD4^{pos};
- Avaliação da capacidade do *Tnp* em gerar células reguladoras (pDC, Treg);
- Efeito do *Tnp* em células da microglia e macrófagos infiltrantes;
- Passagem pela BHE e localização do *Tnp* no SNC.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizadas fêmeas da linhagem C57BL/6 selvagens (*WT*) e deficientes no gene de IL-10 (*KO*) com 6 a 8 semanas de idade fornecidos pelo Biotério do Instituto Butantan e pelo Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, respectivamente. Os animais foram mantidos em estantes ventiladas com condições controladas de temperatura e umidade e livres de patógenos. Todos os procedimentos estão em acordo com as diretrizes providas pela Comissão de Ética do Instituto Butantan (nº 747/10) e pela Comissão de Ética do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (nº 74 nas fls. 89 do livro 02).

4.2 Obtenção do MOG₃₅₋₅₅

O peptídeo MOG₃₅₋₅₅ (*Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein* -MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) foi sintetizado em sintetizador múltiplo (*Advanced ChemTech* 90 Louisville, KY) (HARRISON et al., 1997) utilizando-se química Fmoc e síntese em fase sólida em resina Rink Amide na Unidade de Síntese Peptídica do LETA no Instituto Butantan. Todas as reações de acilação foram efetuadas em excesso de três vezes de ativação dos aminoácidos Fmoc e tempos de acoplamento de 20 min. Cada aminoácido Fmoc foi acoplado, pelo menos, duas vezes. A clivagem e desproteção do sítio de ligação foram feitas pelo tratamento da resina com 90% de ácido trifluoroacético, 5% thioanisole, 2,5% fenol e 2,5% de água. A análise da seqüência peptídica foi verificada por espectrometria de massas LCMS módulo positivo (Thermo), enquanto a pureza do material (> 80%) foi avaliada por cromatografia em fase reversa HPLC LC-6AD (Shimadzu) em coluna preparativa Shim-pack. Este peptídeo foi armazenado -20 °C até o momento do uso.

4.3 Obtenção do Tnp

O *Tnp* é um peptídeo cíclico obtido por síntese peptídica artificial e foi cedido pelo Laboratório Farmacêutico Cristália. A dose utilizada foi estabelecida de acordo com os prévios resultados incluídos na Patente INPI0602885-3, EP2046815, US8304382, MX300187.

4.4 Indução da EAE em camundongos

O protocolo de indução de EAE está de acordo com Mendel e colaboradores (1995). Fêmeas C57BL/6 *WT* ou IL-10 *KO* (n= 5/grupo) foram imunizadas subcutaneamente (s.c.) na base da cauda no dia 0 com 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ adsorvido em 100 µL de CFA contendo 500 µg de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (Difco). Nos dias 0 e 2, os animais foram injetados intraperitonealmente (i.p.) com 500 ng da Toxina Pertussis (Sigma Aldrich) em 200 µL de PBS. Animais virgens foram considerados controle sadio. A avaliação clínica da EAE foi feita diariamente e classificada como:

- 0..... normal
- 1..... flacidez caudal
- 2..... reflexo ou andar prejudicado
- 3..... paralisia das patas traseiras
- 4..... paralisia das patas traseiras e dianteira
- 5..... morte

A avaliação clínica cumulativa foi calculada para cada animal individualmente. Os sinais clínicos emergiram a partir do 12º dia com pico de intensidade no 17º, declinando 30 dias após a imunização.

4.5 Tratamento com *Tnp*

Para avaliar o efeito imunomodulatório do *Tnp* na EAE, os animais foram tratados s.c. no dorso pela injeção de 100 µL de *Tnp* a 3 mg/Kg diluídos em salina estéril. Foi realizado 3 esquemas de tratamentos:

- Tratamento Profilático (durante a fase de indução da doença): 1 x ao dia por 10 dias consecutivos do dia 0 ao dia 9;
- Tratamento Terapêutico (durante a fase efetora da doença): 1 x ao dia por 10 dias consecutivos do dia 10 ao dia 19;
- Tratamento Contínuo (durante as fases de indução e efetora da doença): 1 x ao dia por 20 dias consecutivos do dia 0 ao dia 19.

4.6 Obtenção de células esplênicas

Os baços dos animais induzidos a EAE ou sob tratamento foram retirados de forma estéril e em seguida submetidos à maceração com o auxílio de um êmbolo e uma membrana de nylon de 100 µm com meio de cultura RPMI 1640 para recuperação da suspensão celular. Este homogenato foi centrifugado a 400 g por 10 min a 4 °C. Em seguida foi submetido a hemólise e lavagens. O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em meio de cultura. Os grumos eventuais foram retirados por sedimentação por 5 min no gelo e a viabilidade da suspensão obtida pela contagem celular em azul de Trypan.

4.7 Obtenção de células do cérebro e do cordão espinhal

Os cérebros e os cordões espinhais dos animais com EAE ou sob tratamento foram retirados de forma estéril e em seguida submetidos à maceração com o auxílio de um êmbolo e uma membrana de nylon de 100 µm com meio de cultura RPMI 1640 para dissociação do tecido. Esta suspensão celular foi centrifugada a 400 g por 10 min a 4 °C e em seguida submetida à separação por gradiente de Percoll (Sigma). Para isto, as células foram ressuspensas em HBSS contendo 30% de Percoll e adicionadas a uma solução contendo Percoll a 37% e a 70%. Após centrifugação a 500 g por 20 min a 4 °C, os leucócitos foram isolados da interface do gradiente de Percoll e lavados. A análise da viabilidade celular foi realizada pela contagem em azul de Trypan.

4.8 Histologia do cordão espinhal

Para avaliar as alterações histológicas na EAE, animais tratados ou não foram mortos no 17º dia após a imunização. Os cordões espinhais foram removidos e fixados em solução de formol a 4%, para então serem parafinizados, seccionados a 5 µm e fixados em lâmina e submetidos a coloração H&E para a avaliação do infiltrado inflamatório e a coloração Luxol Fast Blue para revelar as áreas desmielinizadas. Os cortes dos cordões espinhais da região cervical dos animais estão de acordo com Yang e colaboradores (2009) e as análises histopatológicas foram realizadas de modo cego. A taxa de desmielinização foi avaliada e classificada como: 0: Ausência de desmielinização; 1: Raros focos de desmielinização; 2: Poucas áreas de desmielinização e 3: áreas confluentes de desmielinização.

4.9 Zimografia para avaliação da atividade proteolítica de MMP

Para avaliar a atividade proteolítica da MMP-2 e da MMP-9 em animais induzidos a EAE ou sob tratamento, o ensaio de zimografia foi realizado no homogenato do cordão espinhal. Alíquotas do sobrenadante (20 µL) foram misturadas em volume igual de tampão de dissociação [63 mmol/L Tris-HCl, pH 6,8] contendo 10% glicerol, 10% sulfato de dodecil sódico (SDS) e 0,0025% Azul de Bromofenol por 5 min a temperatura ambiente. Usando gel a 10% de SDS-PAGE contendo 1 mg/mL de gelatina tipo A, as amostras foram submetidas a eletroforese em corrente de 180 V por 90 min em tampão de corrida Tris-glicina (25 mmol/L Tris, 192 mmol/L glicina, 0,1% SDS, pH 8,3) a 4 °C. O gel foi então lavado em solução 2,7% Triton X-100 por 30 min a temperatura ambiente, seguido por uma incubação adicional de 3 h a 37 °C em tampão de desenvolvimento (50 mmol/L Tris, 200 mmol/L NaCl, 5 mmol/L CaCl₂ e 0,2% Brij35, pH 7,5). Os géis foram finalmente corados com 0,5% Azul de Coomassie dissolvido em 45% metanol, 10% ácido acético e 45% água destilada por 18 h e descorados com solução 7% ácido acético. A proteólise foi detectada pela visualização de bandas claras num fundo azul. Os controles positivos incluem MMP-2 e MMP-9 recombinantes (Calbichem Co., San Diego, CA). Os géis foram escaneados e convertidos em escala de preto e branco no Adobe Photoshop para que a intensidade das bandas fossem quantificadas pelo programa ImageJ. Os resultados são expressos como unidades de densitometria (UD).

4.10 Análise fenotípica das células por citometria de fluxo

Para avaliar as diferentes populações de células ou o estado funcional pela expressão de moléculas membranosas ou intracelulares, as células dos diferentes compartimentos (baço, cérebro e cordão espinhal) obtidas dos animais com EAE ou sob tratamento foram primeiramente neutralizadas com o anticorpo purificado de rato IgG2bk anti-mouse CD16/CD32 por 30 min a 4 °C. Em seguida foram lavadas com meio RPMI 1640 e centrifugadas a 400 *g* por 10 min a 4 °C. O sobrenadante celular foi desprezado e as células foram ressuspensas em meio RPMI 1640 e incubadas por 30 min a 4 °C no escuro com anticorpos (BD PharMingen, Oxford, UK) marcados com diferentes fluorocromos. Após nova lavagem e centrifugação as células foram ressuspensas em formaldeído a 1% e deixadas a 4 °C até a leitura. Para marcação intracelular, as células tratadas por até 6 h com 1 µL de Golgi-PlusTM (Brefeldrin A, BioLegend, San Diego, CA) foram fixadas e permeabilizadas por 20 min no gelo com a solução Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences). Em seguida, foram centrifugadas com a solução de lavagem específica e incubadas por 10 min a 4 °C com anticorpos marcados com diferentes fluorocromos. Após incubação, essas células foram

ressuspensas em formaldeído a 1% e deixadas a 4 °C até a leitura no citometro de fluxo FACsCalibur de quatro cores (BD-Pharmingen, San Diego, CA, USA). Os eventos (50.000) foram adquiridos e analisados com o programa CellQuest Pro (BD-Pharmingen, San Diego, CA, USA). As células foram analisadas inicialmente quanto ao tamanho (FSC) e a granulosidade (SSC) seguido de marcação específica e as células mortas foram dispensadas. Os resultados foram expressos como a média da porcentagem ou pela intensidade média de fluorescência.

4.11 Avaliação de DC e de linfócitos T CD4^{pos}

Para análise da ação imunomodulatória do *Tnp* na fase de indução, as DC e os linfócitos T CD4^{pos} foram avaliados no baço no dia 7 e no cérebro e no cordão espinhal na fase efetora (dia 17). Por citometria de fluxo as cDC (CD11c^{pos} CD11b^{pos}) foram analisadas quanto à expressão de moléculas de superfície como MHC de classe II, CD40, CD80 e CD86, enquanto as pDC (CD11c^{pos} CD45R/B220^{low}) foram analisadas quanto a expressão de superfície das moléculas PDL-1 (CD274) e PDL-2 (CD273). Os linfócitos T CD4^{pos} foram analisados quanto à expressão de superfície das moléculas CD40L, CD69, CD18 e ao conteúdo intracitoplasmático de IFN- γ , IL-17A e IL-4.

4.12 Avaliação de células da microglia e de macrófagos no SNC

Na fase efetora (dia 17) e no dia 30 da EAE o cérebro e o cordão espinhal foram coletados e processados. Após dissociação do tecido, as células mononucleares foram separadas por gradiente de Percoll como descrito anteriormente e marcadas com anticorpos anti-CD11b e anti-CD45 para análise por citometria de fluxo (PASCHALIDIS, et al., 2009). As células da microglia são caracterizadas pela expressão intermediária de CD11b e CD45 (CD11b^{low}CD45^{low}) e os macrófagos infiltrantes, pela alta expressão destes marcadores (CD11b^{high}CD45^{high}).

4.13 Avaliação da indução de células T e B reguladoras e células Th2

Em diferentes fases da doença (dia 7, 17 ou 30) em animais tratados ou não, células do baço, do cérebro e do cordão espinhal foram coletadas e processadas para obtenção da suspensão celular para análise por citometria de fluxo de células Treg (CD4^{pos}CD25^{pos}FoxP3^{pos} intracelular), Breg (CD3^{neg}CD19^{pos}CD5^{pos}CD1d^{pos}) e células Th2 (CD4^{pos}IL-4^{pos} intracelular).

4.14 Acoplamento *Tnp*-FITC e injeção de *Tnp*-FITC

Para visualizar se o *Tnp* atravessou a BHE do SNC, o *Tnp* foi conjugado ao FITC (*fluorescein isothiocyanate*) usando o EZ-Label FITC *Protein Labeling Kit* (Pierce, Rockford, IL) de acordo com as instruções do fabricante. O acoplamento do *Tnp* ao FITC foi confirmado por espectrometria de massas LCMS módulo positivo (Thermo) após separação em coluna Sep-Pack light TC 18. Animais *WT* controle sadios ou induzidos a EAE foram injetados s.c. no dorso com 100 μ L de *Tnp*-FITC (6 mg/Kg) ou com uma quantidade equivalente de FITC puro no 12º dia da imunização. Após 2 h da injeção, os animais foram mortos e o baço, o cérebro e o cordão espinhal foram removidos e fixados em solução de formol a 4%, parafinizados, seccionados a 5 μ m, fixados em lâmina e secas no escuro por 24 h para análise em microscopia de fluorescência (Olympus BX51) pelo uso do programa de imagem Cell[^]F (Olympus, Hamburg, Germany). A sobreposição das fotos monocromáticas e fluorescentes (FITC) foi realizada através do programa Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems, San Jose, CA).

4.15 Análise estatística

As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram detectadas após análise de variância (One-Way ANOVA), seguido do teste não-paramétrico Mann-Whitney ou paramétrico Bonferroni. Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$. Foi empregado o programa SPSS (Release 8.0, Standard Version, 1997).

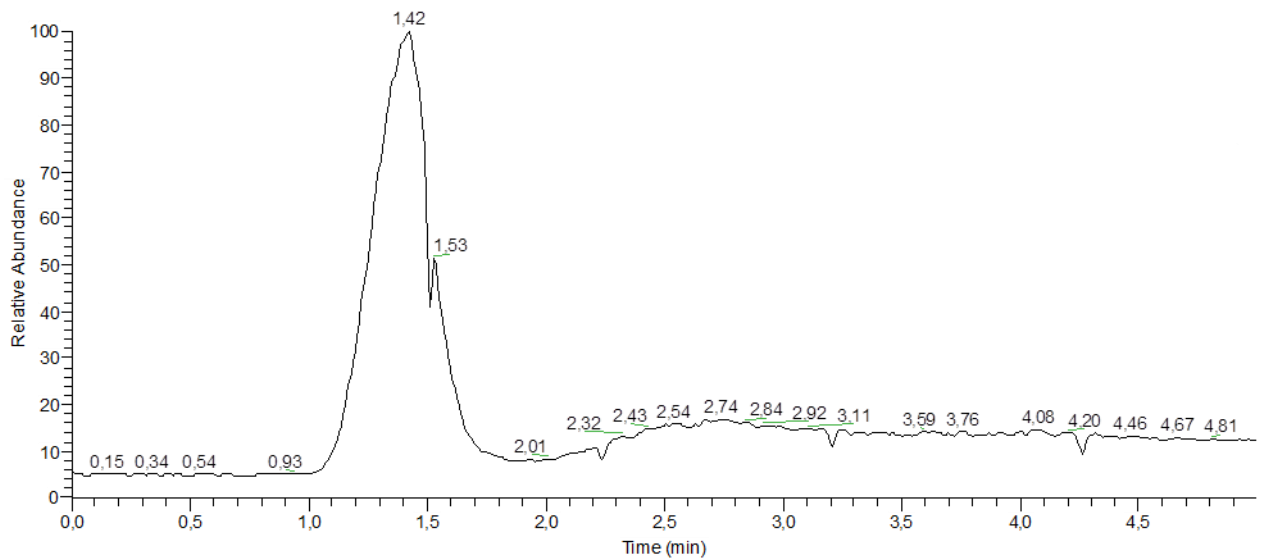
5 RESULTADOS

5.1 Obtenção do MOG₃₅₋₅₅ para indução do modelo de EAE

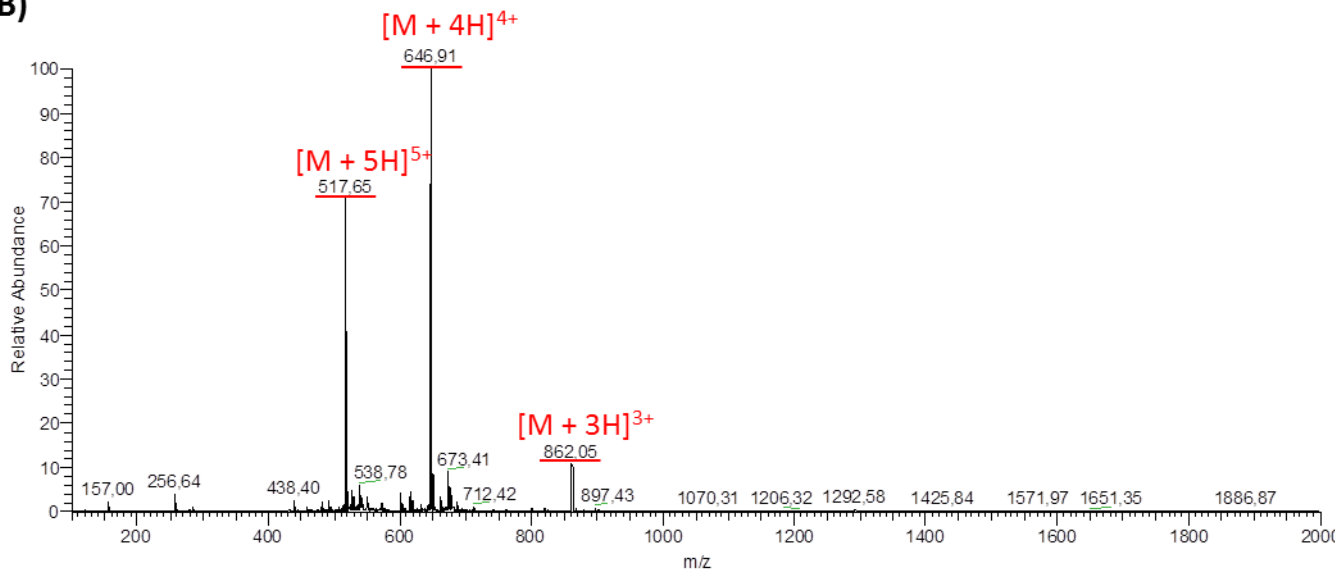
A encefalomielite autoimune experimental (EAE) pode ser induzida em camundongos C57BL/6 fêmeas pela imunização com o peptídeo que corresponde ao epítipo imunodominante MOG₃₅₋₅₅. Neste trabalho, o peptídeo MOG foi sintetizado por nós de acordo Harrison e colaboradores (1997). Podemos observar na Figura **3A** o cromatograma da contagem total de íons (TIC) e o espectro de massas referente à análise do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ (2.581,4 Da) detectado pela presença dos íons múltiplos carregados (massa relativa): 862 [M + 3H]³⁺, 646 [M + 4H]⁴⁺ e 517 [M + 5H]⁵⁺ (Fig. **3B**). A pureza do material foi avaliada por cromatografia em fase reversa HPLC e a fração obtida no espectro cromatográfico correspondente ao peptídeo MOG₃₅₋₅₅ apresentou pureza maior que 80% (Fig. **4**).

Figura 3. Identificação do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ por espectrometria de massas após a síntese

A)

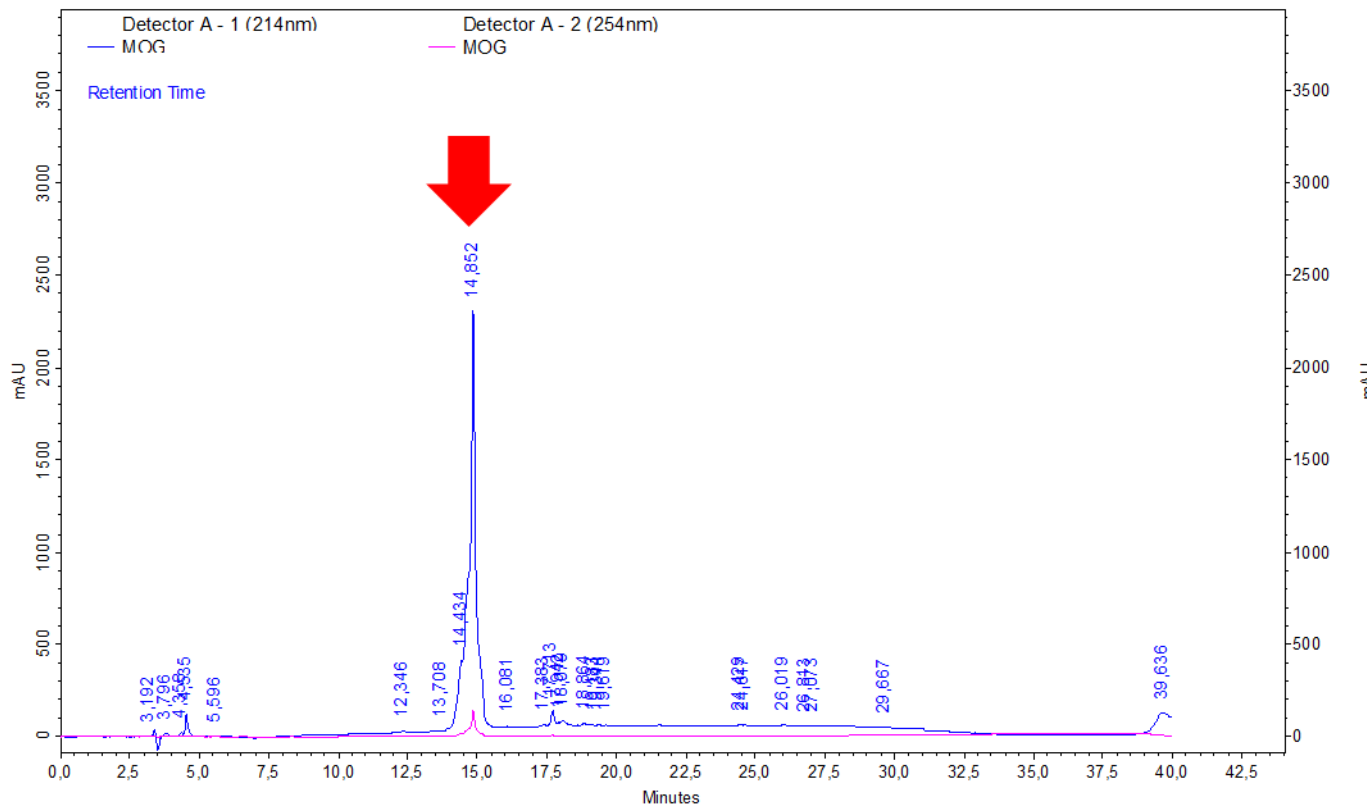


B)



O peptídeo MOG₃₅₋₅₅ (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) foi sintetizado no Advanced Chemtech 90 e purificado por HPLC (Shimadzu) em coluna preparativa Shim-pack. A análise da sequência peptídica foi realizada por espectrometria de massas LCMS (Thermo) em módulo positivo. **A)** Cromatograma da contagem total de íons (TIC). **B)** Espectro de massas referente a análise do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ (2.581,4 Da) detectado pela presença dos íons múltiplos carregados (massa relativa): 862 [M + 3H]³⁺, 646 [M + 4H]⁴⁺ e 517 [M + 5H]⁵⁺.

Figura 4. Purificação do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ por cromatografia de fase reversa HPLC

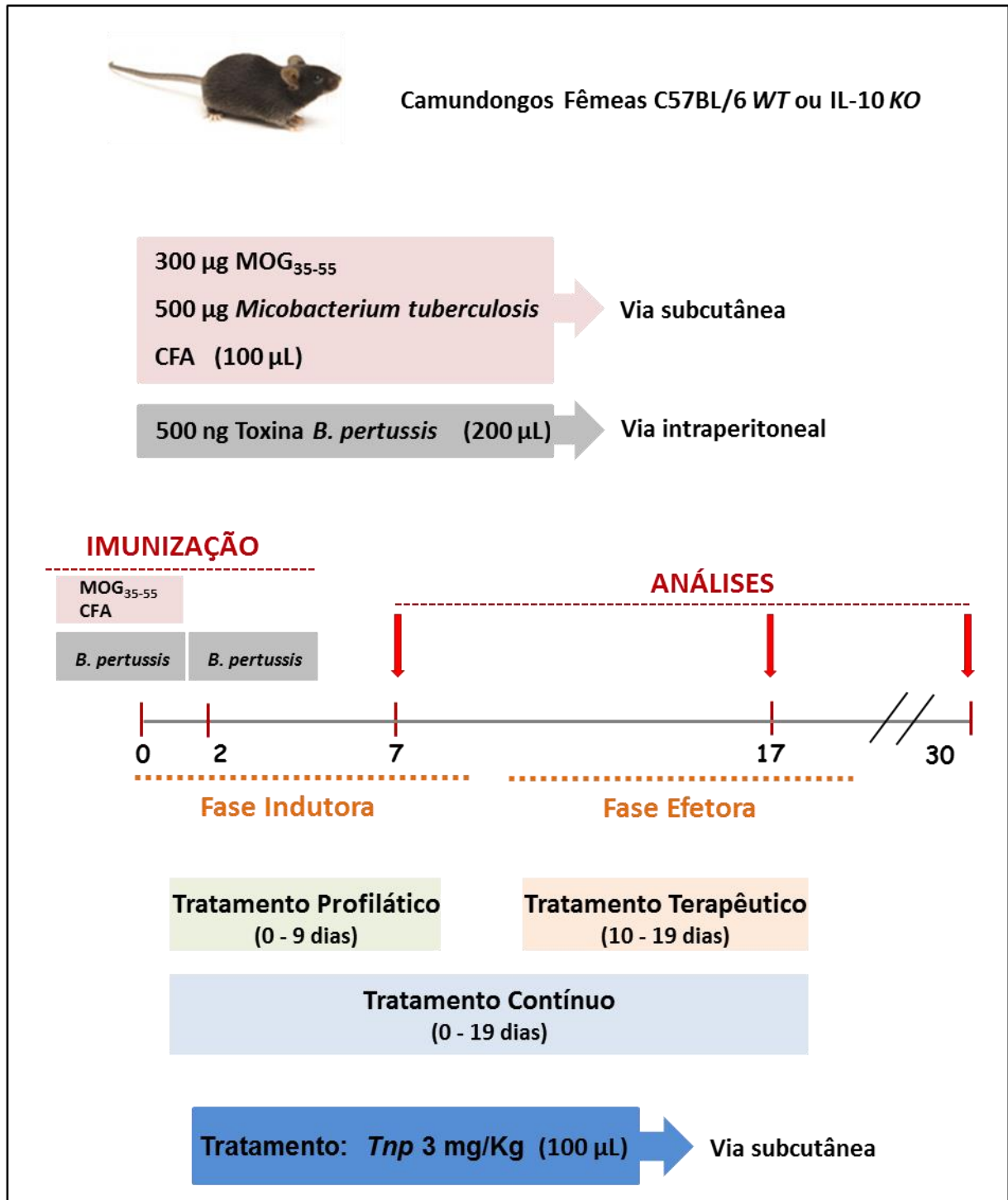


O peptídeo MOG₃₅₋₅₅ (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) foi sintetizado no Advanced Chemtech 90 e purificado por HPLC LC-6AD (Shimadzu). O produto de síntese diluído em tampão A (H₂O 0.1% TFA) foi aplicado em coluna preparativa Shim-pack e eluído com gradiente de tampão B (90% de acetonitrila 10% H₂O 0.1% TFA) de 10 a 80% sob fluxo de 5 mL/min. A fração obtida no espectro cromatográfico corresponde ao peptídeo MOG₃₅₋₅₅ foi confirmado por análise de espectrometria de massas e apresentou pureza maior que 80%.

5.2 Indução de EAE e esquema terapêutico com o Tnp

Fêmeas C57BL/6 *WT* ou IL-10 *KO* (n= 5/grupo) de 6 a 8 semanas de idade foram imunizadas s.c. na base da cauda no dia 0 com 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ adsorvido em 100 µL de CFA contendo 500 µg de *Mycobacterium tuberculosis*. Nos dias 0 e 2, os animais foram injetados i.p. com 500 ng da toxina *Bordetella Pertussis* em 200 µL de PBS. Para avaliar o efeito imunomodulador do *Tnp* na EAE, os animais foram tratados s.c. no dorso pela injeção de 100 µL de *Tnp* a 3 mg/Kg diluídos em salina estéril. Foi realizado 3 esquemas de tratamento: Profilático (durante a fase de indução da doença): 1 x ao dia por 10 dias consecutivos (do dia 0 ao dia 9); Terapêutico (durante a fase efetora da doença): 1 x ao dia por 10 dias consecutivos (do dia 10 ao dia 19); e Contínuo (durante as fases de indução e efetora da doença): 1 x ao dia por 20 dias consecutivos (do dia 0 ao dia 19); enquanto outro grupo de animais com EAE foi tratados somente com salina 0,9% seguindo o mesmo regime (Fig. 5).

Figura 5. Indução da EAE e Esquema terapêutico com o *Tnp*



Fêmeas C57BL/6 ($n = 5/\text{grupo}$) de 6 – 8 semanas de idade foram imunizadas s.c. na base da cauda no dia 0 com 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ adsorvido em 100 µL de CFA contendo 500 µg de *M. tuberculosis* H37Ra. Nos dias 0 e 2 foram injetadas i.p. com 500 ng da toxina *Bordetella Pertussis* em 200 µL de PBS. O tratamento com o *Tnp* foi realizado pela injeção s.c. no dorso de 100 µL de solução a 3 mg/kg em salina estéril: durante a fase de indução da doença (Profilático: 0-9 dias), durante a fase efetora da doença (Terapêutico: 10-19 dias) e durante as fases de indução e efetora da doença (Contínuo: 0-19 dias). Durante o curso da doença os animais foram avaliados diariamente quanto aos sintomas e mortos nos dias 7, 17 ou 30 para obtenção de amostras.

5.3 O tratamento com o *Tnp* melhora e adia os sinais clínicos da EAE parcialmente dependente de IL-10

Para avaliar o efeito imunomodulador do peptídeo *Tnp* no controle dos sinais clínicos da EAE, e ao mesmo tempo investigar a necessidade da IL-10 nesta inibição, distintos esquemas de tratamento com o *Tnp* foram utilizados em diferentes fases da doença como descrito anteriormente usando animais C57BL/6 *WT* ou deficientes em IL-10.

Nas Figuras **6A**, **6C** e **6E** observamos o efeito dos diferentes protocolos de tratamento com o *Tnp* em animais *WT* com EAE. Observamos inicialmente que animais C57BL/6 *WT* induzidos a EAE demonstraram sintomas neurológicos compatíveis com a doença (círculos pretos), validando assim o modelo. Estes animais, demonstraram sinais clínicos de nível 1 (flacidez caudal) a partir do dia 12, passando para nível 2 (reflexo ou andar prejudicado) entre os dias 13 a 16. Entre os dias 17 a 23 observamos um nível máximo dos sintomas, de nível 3 (paralisia das patas traseiras). A partir do dia 24 até o 25 os sintomas começam a declinar de intensidade (nível 2,5) permanecendo entre os dias 26 a 30 no nível 2. A média da intensidade dos sintomas durante o curso da doença foi de nível 2,1 (Tabela I).

Já os animais *WT* com EAE submetidos ao tratamento profilático com o *Tnp* (Fig. **6A**, círculos brancos) apresentaram uma melhora do quadro sintomático, apresentando entre os dias 11 a 20 sintomas de nível 1, que aumentaram para o nível 1,5 entre os dias 21 a 26, e declinaram para o nível 1 entre os dias 27 e 30. Nestes animais observamos que o tratamento profilático adiou o início do aparecimento dos sintomas máximos (de 17 para 21) e a média de intensidade dos sintomas nestes animais foi de 1,2 em relação a 2,1 nos animais C57BL/6 *WT* induzidos a EAE (Tabela I).

O tratamento terapêutico (Fig. **6C**) com o *Tnp* nos animais *WT* com EAE induziu também melhora dos sintomas clínicos com os animais apresentando sintomas de nível 1 entre os dias 12 a 14, de nível 1,7 entre os dias 15 a 18, alcançando uma alta intensidade de sintomas de nível 2,1 entre os dias 19 a 23, que diminuiu para 1,7 entre os dias 24 a 26 e para 1,2 entre os dias 27 a 30. Nestes animais observamos que o tratamento terapêutico adiou o início dos sintomas máximos (de 17 para 19) e a média de intensidade dos sintomas nestes animais foi de nível 1,5 em relação a 2,1 nos animais C57BL/6 *WT* induzidos a EAE (Tabela I).

Já o tratamento contínuo (Fig. **6E**) com o *Tnp* nos animais *WT* com EAE reduziu o nível dos sintomas para 0,5 entre os dias 11 a 13, entre os dias 14 a 20 o nível dos sintomas foi o nível 1,1; entre os dias 21 a 25 foi de 1,5 e declinou para 1,3 entre os dias 26 a 30. Nestes animais observamos que o tratamento continuado com o *Tnp* adiou o início dos sintomas máximos (de 17 para 21) e a

media de intensidade dos sintomas nestes animais foi de nível 1,1 em relação a 2,1 nos animais C57BL/6 WT induzidos a EAE (Tabela I).

Tabela 1 - Resumo dos resultados de animais C57BL/6 WT induzidos a EAE e tratados com o Tnp em distintos esquemas terapêuticos

Tratamento	Incidência de animais com sinais máximos	Média do dia dos sinais clínicos máximo	Média dos sinais clínicos máximo	Média dos sinais clínicos
Salina 0,9%	5/5	17	3,0	2,1
Tnp Profilático	1/5	21*	1,5*	1,2*
Tnp Terapêutico	1/5	19*	2,1*	1,5*
Tnp Contínuo	1/5	21*	1,5*	1,1*

A tabela mostra os resultados de três experimentos independentes (n=5 animais para cada grupo de três experimentos). * $p < 0,05$ em relação aos animais C57BL/6 WT induzidos a EAE tratados apenas com salina 0,9%.

Nas Figuras **6B**, **6D** e **6F** podemos observar que animais C57BL/6 IL-10 KO são mais susceptíveis à indução de EAE, apresentando sintomas máximos de nível 2,3 no dia 10, os quais permaneceram durante todo o período observado.

Na ausência de IL-10 o tratamento profilático com o Tnp (Fig. **6B**) manteve os sintomas no nível de 0,9 entre os dias 12 a 16, nível 1,7 entre os dias 17 a 22, e de nível 1,1 entre os dias 23 a 30. Neste grupo de animais o Tnp continuou controlando os sintomas, diminuindo a media de intensidade para o nível 1,2 em relação ao nível de 2,3 dos animais IL-10 KO induzidos a EAE e adiou o pico de aparecimento dos sintomas graves de 10 para 17 (Tabela II). O tratamento terapêutico (Fig. **6D**) nos animais deficientes de IL-10 induziu sintomas de nível 2 entre os dias 11 a 17, de nível 1,9 entre os dias 18 a 22, e de nível 2,1 entre os dias 23 a 30. Neste grupo de animais o Tnp não controlou os sintomas mantendo a media de intensidade no nível 2 em relação ao nível de 2,3 dos animais IL-10 KO induzidos a EAE e não adiou o pico de aparecimento dos sintomas graves, mantendo em 11. Em comparação aos animais WT induzidos a EAE igualmente tratados de forma terapêutica com o Tnp podemos observar que a ausência de IL-10 determinou uma antecipação do dia de aparecimento dos sintomas máximos (de 19 para 11) e aumentou a media de intensidade dos sintomas de 1,5 para 2,0 (Tabela II). Isto demonstra que no tratamento terapêutico o efeito do Tnp no adiamento do aparecimento dos sintomas graves ou na diminuição da media de intensidade dos sintomas é dependente de IL-10.

Já o tratamento contínuo (Fig. 6F) nos animais deficientes de IL-10 induziu sintomas de nível 0,9 entre os dias 10 a 12, de nível 1,1 entre os dias 13 a 16, de nível 2,0 entre os dias 17 a 23, e de nível 1,9 entre os dias 24 a 30. Neste grupo de animais o *Tnp* controlou os sintomas diminuindo a media de intensidade para o nível 1,5 em relação ao nível de 2,3 dos animais IL-10 *KO* induzidos a EAE e adiou o pico de aparecimento dos sintomas graves de 10 para 17 (Tabela II). Em comparação aos animais *WT* induzidos a EAE igualmente tratados de forma continuada com o *Tnp* podemos observar que a ausência de IL-10 determinou apenas aumento na media dos sinais clínicos máximos, de 1,5 para 2,0. Isto demonstra que o efeito do *Tnp* na diminuição da media de intensidade dos sintomas é dependente de IL-10.

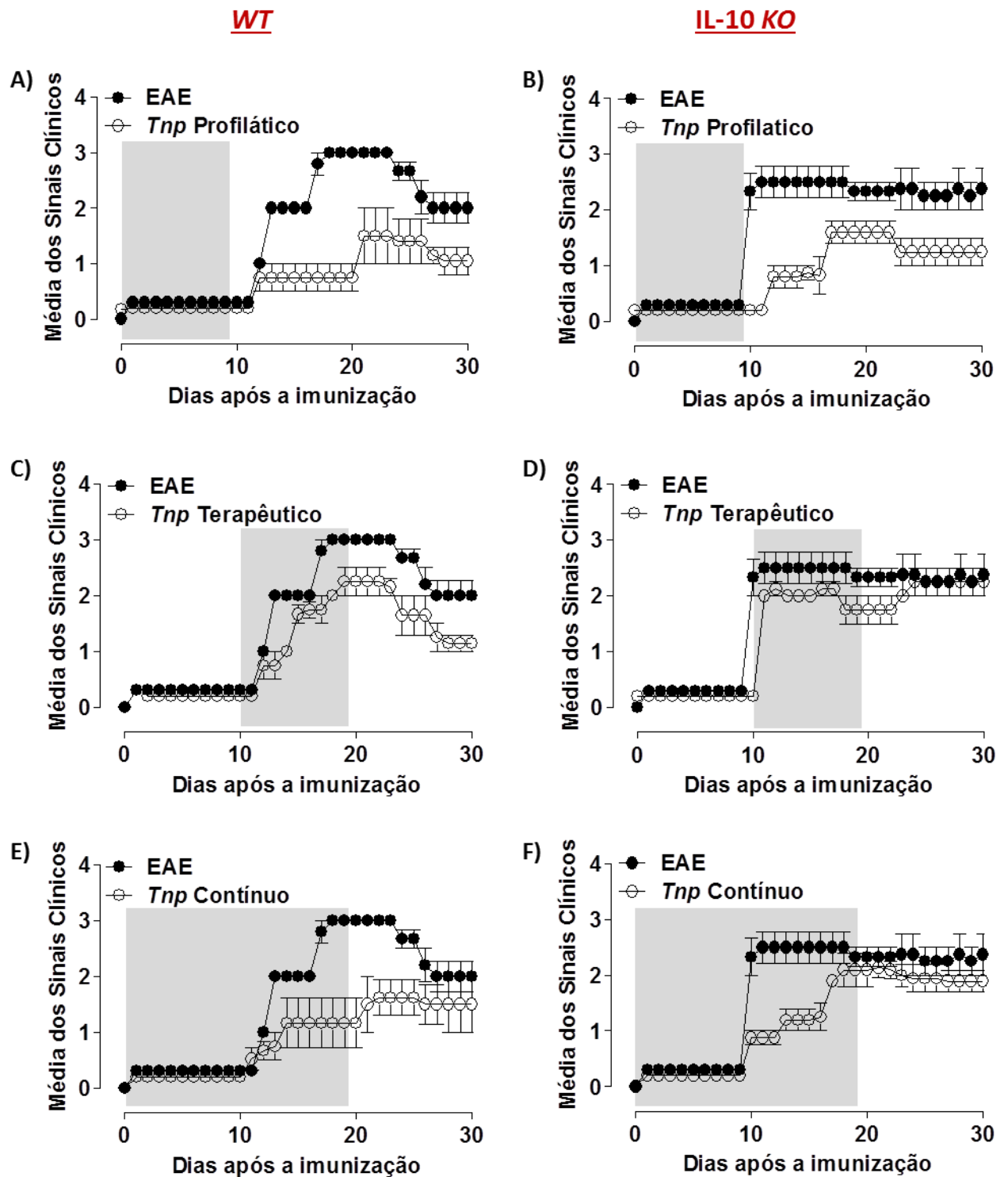
Tabela 2 - Resumo dos resultados de animais C57BL/6 IL-10 KO induzidos a EAE e tratados com o *Tnp* em distintos esquemas terapêuticos

Tratamento	Incidência de animais com sinais máximos	Média do dia dos sinais clínicos máximo	Média dos sinais clínicos máximo	Média dos sinais clínicos
Salina 0,9%	5/5	10	2,3	2,3
<i>Tnp</i> Profilático	2/5	17*	1,7*	1,2*
<i>Tnp</i> Terapêutico	2/5	11 [#]	2,0 [#]	2,0 [#]
<i>Tnp</i> Contínuo	2/5	17*	2,0 [#]	1,5*

A tabela mostra os resultados de três experimentos independentes (n=5 animais para cada grupo de três experimentos). * $p < 0,05$ em relação aos animais C57BL/6 IL-10 *KO* induzidos a EAE tratados somente com salina 0,9%. [#] $p < 0,05$ indicativo da dependência de IL-10 em relação aos animais C57BL/6 *WT* induzidos a EAE tratados no mesmo esquema terapêutico.

Em conjunto, estes resultados mostram que tanto o tratamento profilático com o *Tnp* quanto o terapêutico conseguem adiar significativamente o aparecimento do pico de sintomas graves, sendo o tratamento profilático mais efetivo no adiamento e na diminuição da média de intensidade dos sintomas. Ainda, a soma dos tratamentos profilático e terapêutico não é suficiente para gerar um adiamento maior no pico de aparecimento dos sintomas graves nem em diminuir ainda mais a média de intensidade dos sintomas. E, finalmente, no esquema terapêutico de tratamento o *Tnp* age adiando os sintomas graves e diminuindo a media de intensidade dos sintomas de maneira dependente de IL-10.

Figura 6. O tratamento com o *Tnp* melhora e adia os sinais clínicos da EAE parcialmente dependente de IL-10



Fêmeas C57BL/6 WT (*esquerda*) ou IL-10 KO (*direita*) induzidas a EAE ativamente foram tratadas diariamente com 100 μ L de *Tnp* a 3 mg/kg em salina estéril nos esquemas: Profilático (0-9 dias) (A e B), Terapêutico (10-19 dias) (C e D) ou Contínuo (0-19 dias) (E e F), representado pelos quadrantes cinza ao fundo. Os sinais clínicos da EAE foram avaliados diariamente como a seguir para obtenção da média dos animais de cada grupo: 0_normal; 1_flacidez caudal; 2_reflexo ou andar prejudicado; 3_paralisia das patas traseiras; 4_paralisia das patas traseiras e dianteira; 5_morte.

5.4 O *Tnp* é capaz de suprimir a ativação de cDC nos órgãos linfoides secundários dependente de IL-10

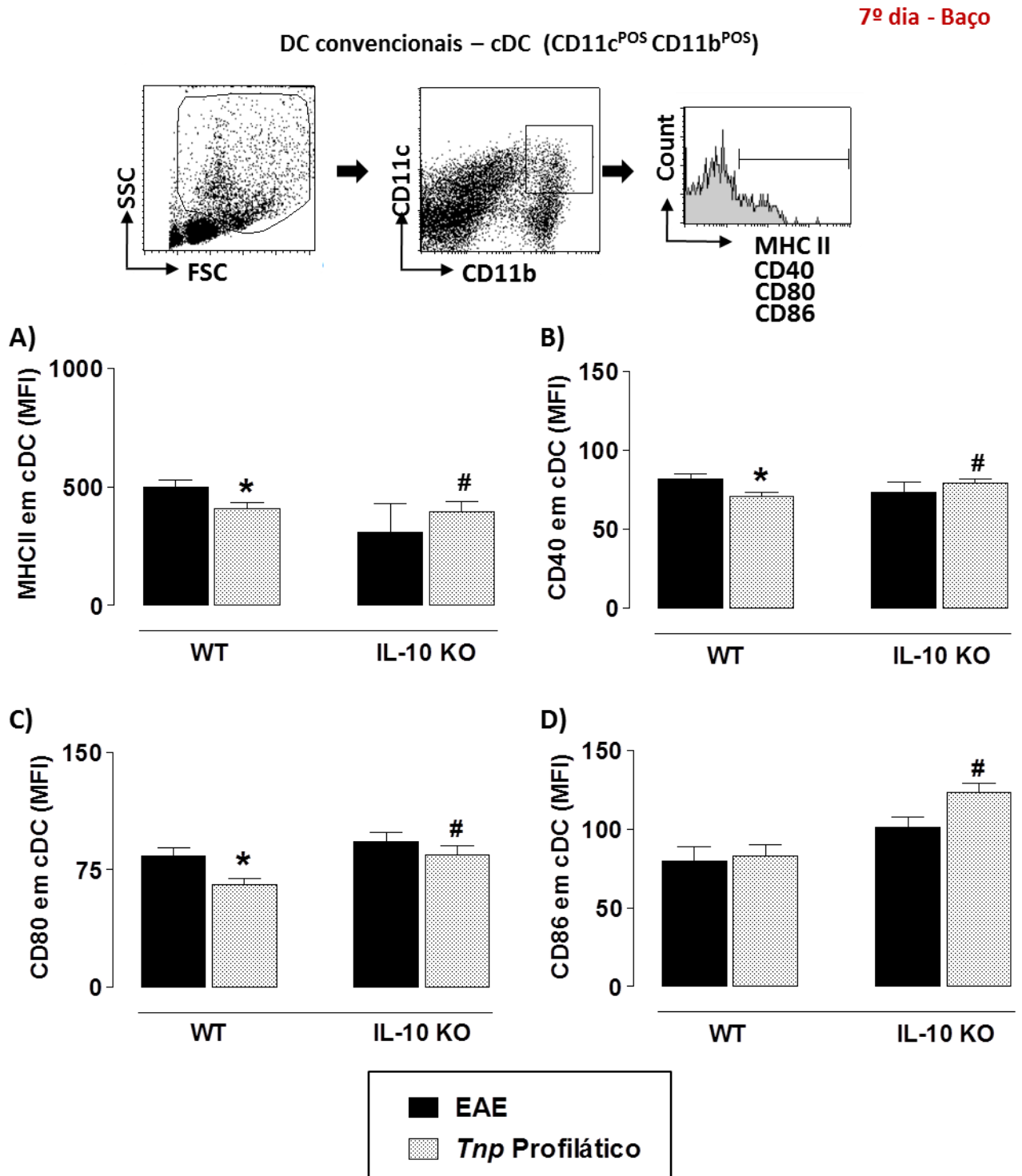
As DC são um grupo heterogêneo de células apresentadoras de antígenos profissionais envolvidas em ambas as respostas: imunogênica ou tolerogênica. Durante doenças autoimunes, como no modelo de EAE, o balanço entre DC convencionais (cDC - CD11c^{pos}CD11b^{pos}), que tendem a mediar a doença e DC plasmocitóides (pDC – CD11c^{pos} CD45R/B220^{low}) relacionadas à proteção da doença é decisivo para a progressão ou o controle da EAE. Neste contexto, avaliamos a capacidade do *Tnp* em modular o perfil de resposta de DC na EAE. Para isto, 7 dias após a indução da EAE e tratamento diário com o *Tnp*, células esplênicas destes animais foram avaliadas por citometria de fluxo quanto à expressão de moléculas ativadoras (MHCII, CD40, CD80 e CD86) em cDC e moléculas inibitórias (PDL-1 e PDL-2) em pDC. Bem como avaliamos o papel da IL-10 no efeito do *Tnp* pelo uso de animais *KO*.

Nossos resultados na Figura 7 mostram que nos animais *WT* com EAE o *Tnp* foi capaz de diminuir a expressão de MHC de classe II em 19% (Fig. 7A), de CD40 em 14% (Fig. 7B) e de CD80 em 30% (Fig. 7C), sem alterar a expressão da molécula CD86 nas cDC (Fig. 7D). Quando os animais com EAE deficientes em IL-10 receberam o tratamento profilático com o *Tnp* observamos em comparação com o grupo EAE sem tratamento que não houve alteração na expressão de MHC de classe II (Fig. 7A), de CD40 (Fig. 7B) e de CD80 (Fig. 7C). Ao contrário, a ausência de IL-10 refletiu em uma maior expressão de CD86 nas cDC (Fig. 7D). Sendo assim, a diminuição da expressão de MHC de classe II, CD40 e CD80, bem como a manutenção homeostática de CD86 em células dendríticas convencionais induzida pelo *Tnp* depende da ação de IL-10.

Podemos observar na Figura 8 que nos animais *WT* com EAE o tratamento com o *Tnp* foi capaz de induzir nas pDC um aumento de 4,8 para 6,6 na expressão de PDL-1 (Fig. 8A) e um aumento de 3,4 para 4,1 na expressão de PDL-2 (Fig. 8B). Pelo uso de animais deficientes de IL-10, observamos que o *Tnp* foi capaz de induzir apenas um aumento de 2,2 para 4,1 na expressão de PDL-2, mas não de PDL-1 como observada nos animais *WT*. Portanto, apenas o aumento da expressão de PDL-1, mas não de PDL-2, induzida pelo *Tnp* em pDC é dependente da citocina IL-10.

Em conjunto, o efeito do *Tnp* na diminuição dos sintomas clínicos da EAE pode estar relacionado a sua capacidade de modular o perfil de DC nos órgãos linfoides secundários suprimindo moléculas importantes (MHCII, CD40 e CD80) para a apresentação de antígenos, de maneira dependente de IL-10, e favorecendo a expressão de moléculas inibitórias nas pDC parcialmente dependente de IL-10.

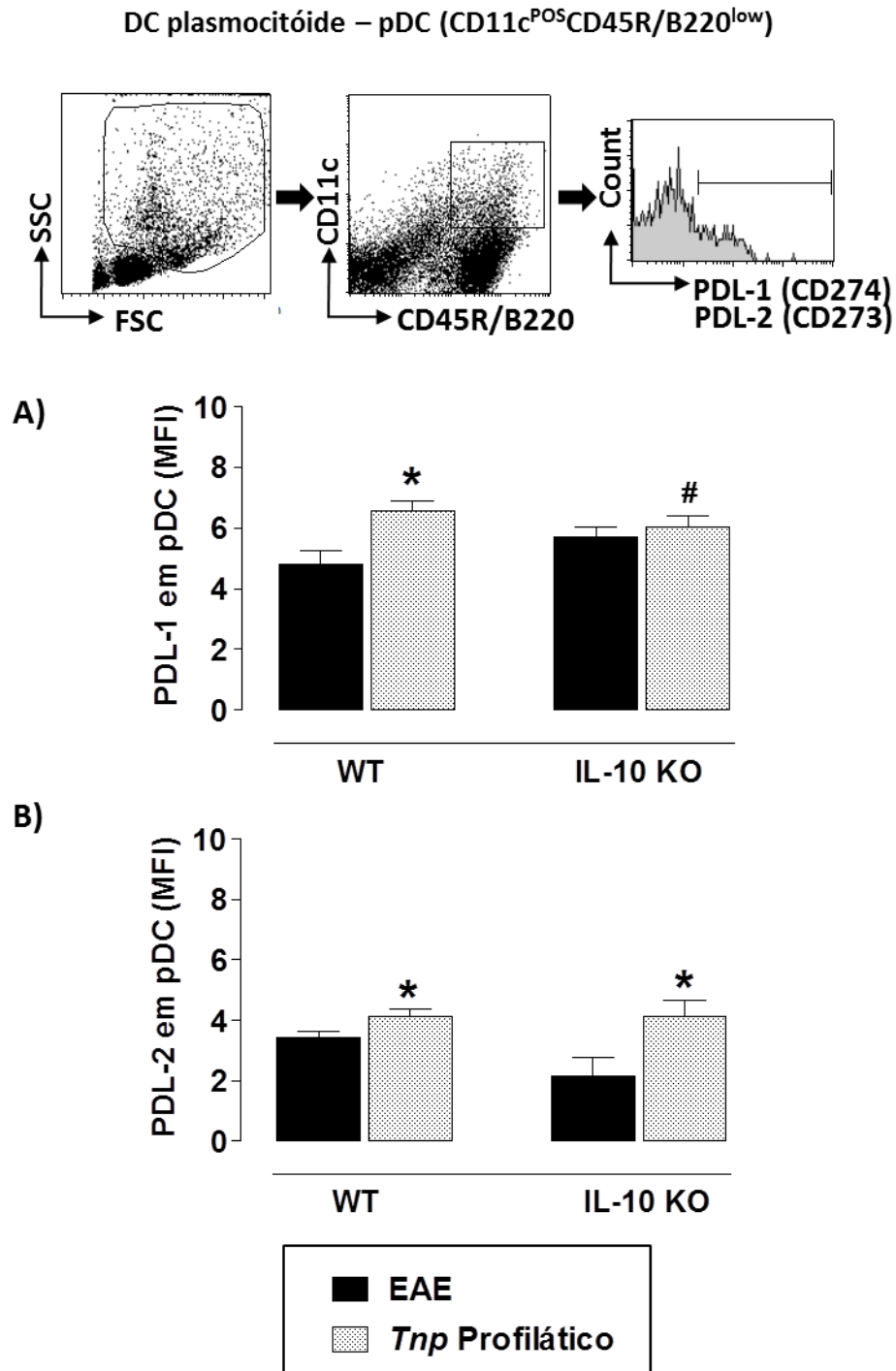
Figura 7. O *Tnp* é capaz de suprimir a ativação de cDCs nos órgãos linfoides secundários dependente de IL-10



Fêmeas WT ou IL-10 KO induzidas a EAE ativamente tratadas ou não diariamente durante a fase de indução da doença com 3 mg/Kg do peptídeo *Tnp* foram mortas após 7 dias da imunização e tiveram o baço retirado e processado para obtenção de suspensão celular que foi analisada por citometria de fluxo quanto à expressão de moléculas de MHC classe II (A) ou de ativação como: CD40 (B), CD80 (C) e CD86 (D) em células dendríticas convencionais (cDC - CD11b^{POS} CD11c^{POS}). Cada barra representa valores de MFI acrescidos do desvio-padrão. * $p < 0,05$ em relação ao grupo EAE tratado apenas com salina 0,9% e # $p < 0,05$ indicativo da dependência de IL-10 em relação ao grupo de animais WT com EAE tratados com *Tnp*.

Figura 8. O *Tnp* favorece a diferenciação de pDCs nos órgãos linfoides secundários parcialmente dependente de IL-10

7º dia - Baço



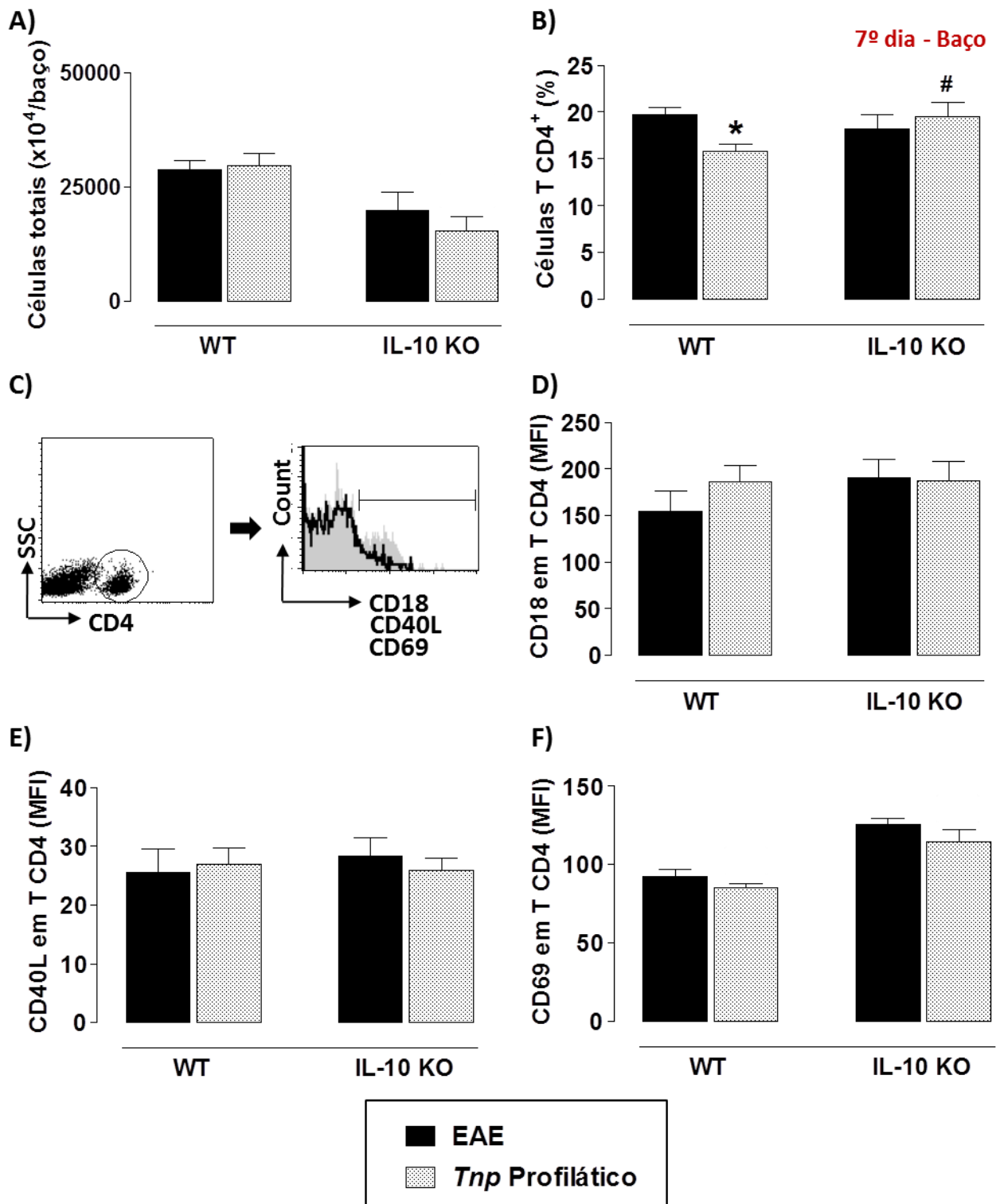
Fêmeas *WT* ou *IL-10 KO* induzidas a EAE ativamente tratadas ou não diariamente durante a fase de indução da doença com 3 mg/Kg do peptídeo *Tnp* foram mortas após 7 dias da imunização e tiveram o baço retirado e processado para obtenção de suspensão celular que foi analisada por citometria de fluxo quanto à expressão das moléculas PDL-1 (A) ou PDL-2 (B) nas células pDC (CD11c^{POS}B220^{low}). Cada barra representa valores de MFI acrescidos do desvio-padrão. * $p < 0,05$ em relação ao grupo EAE tratado apenas com salina 0,9% e # $p < 0,05$ indicativo da dependência de IL-10 em relação ao grupo de animais *WT* com EAE tratados com *Tnp*.

5.5 O *Tnp* via IL-10 suprime a população de linfócitos T CD4^{pos} durante a fase de indução da EAE

Sabendo que os linfócitos T CD4^{pos} são os responsáveis pelo desenvolvimento da EAE em camundongos e que o estado de ativação das APC, responsáveis por ativar estes linfócitos está prejudicado pelo tratamento profilático avaliamos se o *Tnp* poderia modular a ativação de linfócitos T CD4^{pos}, bem como o requerimento da IL-10 neste processo. Para isto, 7 dias após a indução da EAE e tratamento diário com o *Tnp*, células esplênicas destes animais foram avaliadas.

Podemos observar na Figura 9 que os animais *WT* com EAE tratados de forma profilática com o *Tnp* apresentaram uma diminuição de 20% na porcentagem de linfócitos T CD4^{pos} (Fig. 9B), sem contudo apresentarem alteração no número total de leucócitos no baço (Fig. 9A), ou na expressão da molécula CD18 (Fig. 9D), CD40L (Fig. 9E) ou de CD69 (Fig. 9F). Quando os animais deficientes em IL-10 com EAE foram tratados com o *Tnp* de forma profilática observamos que a diminuição dos linfócitos T CD4^{pos} no baço foi dependente da ação desta citocina, pois os animais IL-10 *KO* tratados com o *Tnp* não foram capazes de suprimir a população dos linfócitos T CD4^{pos} neste órgão (Fig. 9B). Sendo assim, o *Tnp* por mecanismos dependentes de IL-10 suprime a população de linfócitos T CD4^{pos} nos órgãos linfoides secundários durante a indução da EAE.

Figura 9. O *Tnp* suprime a população de linfócitos T CD4^{POS} nos órgãos linfoides secundários via IL-10



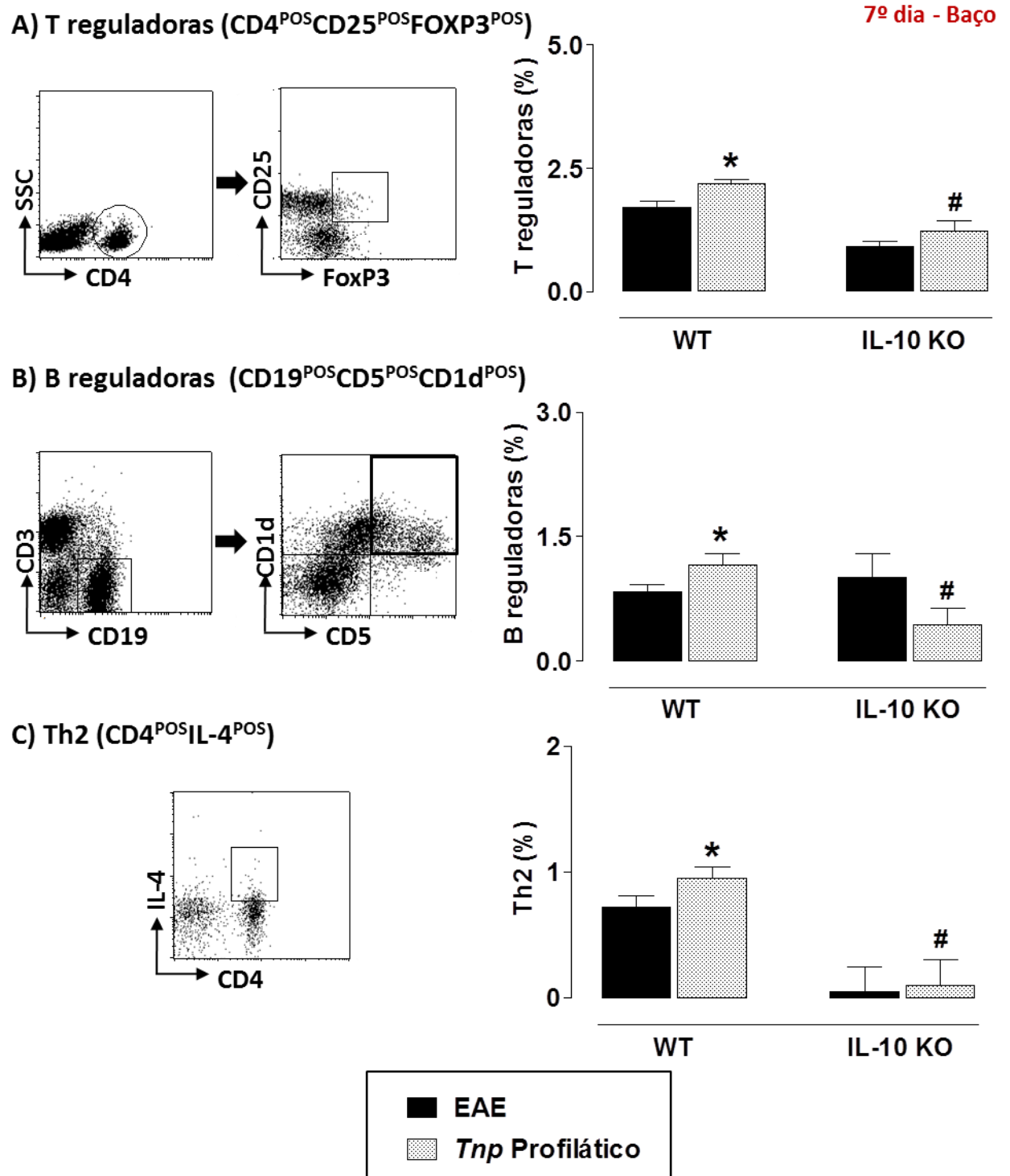
Fêmeas WT ou IL-10 KO induzidas a EAE ativamente tratadas ou não diariamente durante a fase de indução da doença com 3 mg/Kg do peptídeo *Tnp* foram mortas após 7 dias da imunização e tiveram o baço retirado e processado para obtenção de suspensão celular que foi contada em Câmara de Neubauer (A) ou analisada por citometria de fluxo quanto a porcentagem de linfócitos T CD4^{POS} (B) ou quanto à expressão das moléculas (C) nos linfócitos T CD4^{POS}: CD18 (D), CD40L (E) ou CD69 (F). Cada barra representa valores de MFI acrescidos do desvio-padrão. * $p < 0,05$ em relação ao grupo EAE tratado apenas com salina 0,9% e # $p < 0,05$ indicativo da dependência de IL-10 em relação ao grupo de animais WT com EAE tratados com *Tnp*.

5.6 O *Tnp* via IL-10 induz células reguladoras nos órgãos linfoides secundários

Células reguladoras se apresentam como decisivas no controle da magnitude de inflamações autoimunes (ZOZULYA; WIENDL, 2008). Neste sentido, avaliamos a capacidade do *Tnp* induzir células Treg, Breg ou mesmo clones de linfócitos Th2 produtores de IL-4 nos órgãos linfoides secundários dos animais induzidos a EAE. Para isto, 7 dias após a indução da EAE e tratamento diário com o *Tnp*, células esplênicas destes animais foram avaliadas.

Podemos observar na Figura **10** que o tratamento profilático com o *Tnp* foi capaz de gerar células reguladoras como Treg $CD4^{pos}CD25^{pos}FOXP3^{pos}$ (de 1,7% para 2,2% - Fig. **10A**), Breg ($CD5^{pos}CD19^{pos}CD1d^{pos}$) (de 0,8% para 1,4% - Fig. **10B**) e Th2 produtores de IL-4 (de 0,70% para 0,90% - Fig. **10C**) por mecanismos totalmente dependentes de IL-10, uma vez que os animais deficientes de IL-10 não foram capazes de gerar tais células reguladoras em resposta ao *Tnp*.

Figura 10. O *Tnp* gera células reguladoras nos órgãos linfoides secundários dependente de IL-10



Fêmeas WT ou IL-10 KO induzidas a EAE ativamente tratadas ou não diariamente durante a fase de indução da doença com 3 mg/Kg do peptídeo *Tnp* foram mortas após 7 dias da imunização e tiveram o baço retirado e processado para obtenção de suspensão celular que foi analisada por citometria de fluxo para a determinação da porcentagem de linfócitos T reguladores (A), B reguladores (B) ou Th2 (C). Cada barra representa a média das porcentagens dos diferentes grupos acrescidos do desvio-padrão. * $p < 0,05$ em relação ao grupo EAE tratado apenas com salina 0,9% e # $p < 0,05$ indicativo da dependência de IL-10 em relação ao grupo de animais WT com EAE tratados com *Tnp*.

5.7 O *Tnp* controla o infiltrado celular e a desmielinização no SNC independente de IL-10 no pico da doença

A infiltração de células T auto-reativas e posteriormente de macrófagos no SNC marca o início dos sintomas na EAE (ARCHELOS et al., 1999; ENGELHARDT et al., 1998; ENGELHARDT et al., 2003) e tratamentos que consigam reduzir o infiltrado celular no SNC e prevenir a desmielinização são de grande valia para a supressão clínica da doença (MIYAMOTO et al., 2006). Para verificar se o infiltrado celular e a desmielinização do SNC são suprimidos pelo *Tnp*, bem como avaliar a participação de IL-10 neste processo, os cérebros e os cordões espinhais de animais *WT* ou *IL-10 KO* induzidos a EAE e expostos a distintos esquemas de tratamento com o *Tnp* foram coletados no 17º ou no 30º dia para a contagem total das células no homogenato dos órgãos e para análise histológica.

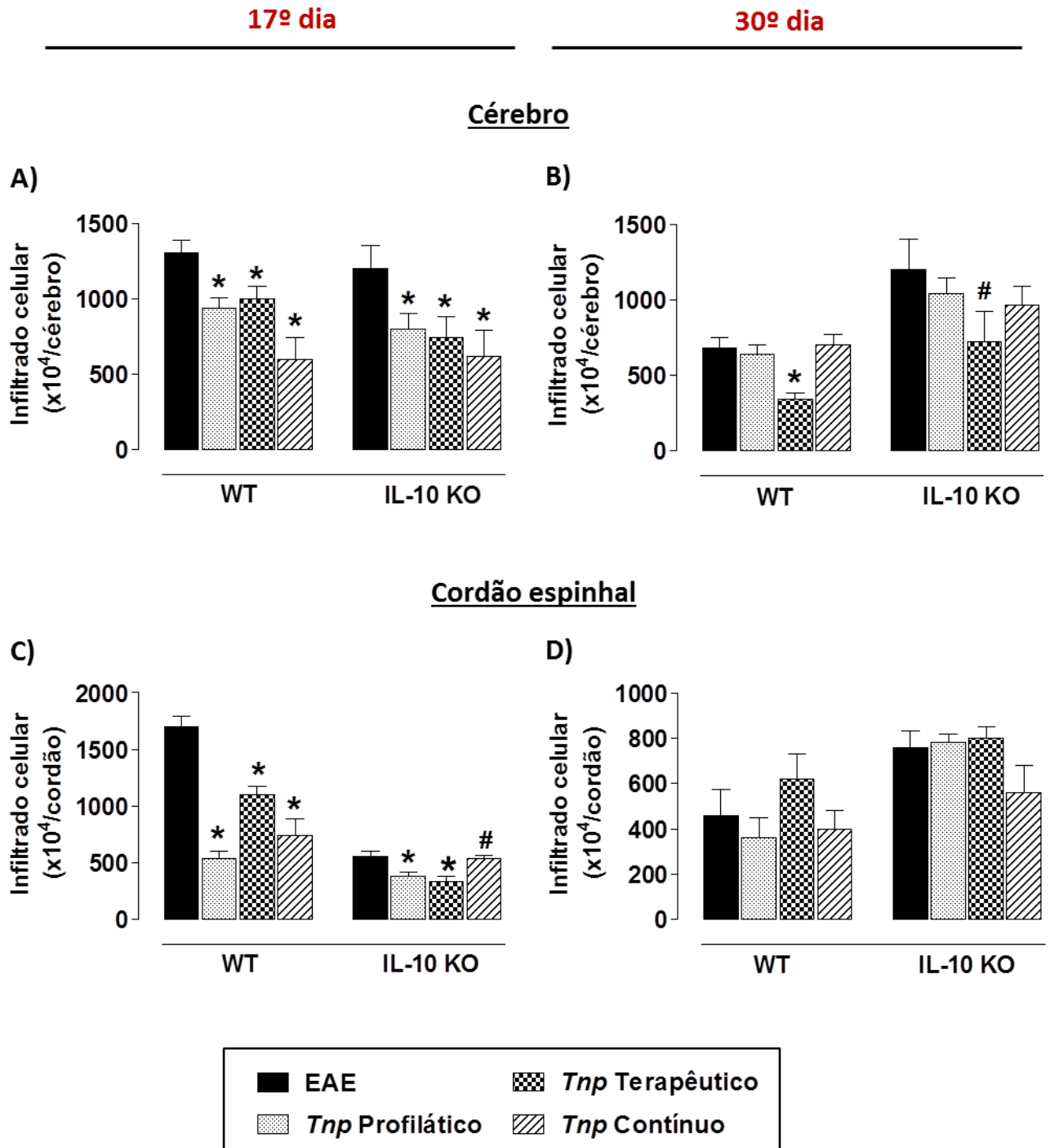
Nossos resultados na Figura 11 mostram que no pico da doença (17º dia) o tratamento profilático, terapêutico ou contínuo com o *Tnp* foi capaz de diminuir o infiltrado celular no cérebro (28%, 23% e 50%, respectivamente – Fig. 11A) e no cordão espinhal (69%, 35% e 55%, respectivamente – Fig. 11C). Esta supressão do infiltrado celular tanto no cérebro como no cordão espinhal induzida pelo *Tnp* neste dia, com exceção do tratamento contínuo no cordão espinhal, ocorreu sem a necessidade da citocina IL-10, uma vez que o tratamento com o *Tnp* também consegue suprimir o infiltrado celular no SNC nos animais deficientes de IL-10.

Com a evolução da doença, no 30º dia de observação verificamos que apenas o tratamento terapêutico com o *Tnp* conseguiu diminuir o influxo celular no cérebro em 50%. Este efeito foi dependente da citocina IL-10, uma vez que nos animais deficientes o *Tnp* deixou de inibir o influxo celular no cérebro neste período (Fig. 11B). No cordão medular não foram observadas alterações no número de células nos animais *WT* ou *KO* submetidos aos diferentes tratamentos. Logo, demonstramos que o *Tnp* é capaz de suprimir no pico da doença o infiltrado inflamatório para o SNC de maneira independente de IL-10, enquanto na fase tardia os efeitos da aplicação terapêutica do *Tnp* são mediados pela IL-10. Estes dados sugerem que mesmo com a doença em curso a aplicação terapêutica do *Tnp* induz a geração de IL-10 útil no controle da inflamação do SNC.

Na Figura 12A, cortes dos cordões obtidos no 17º dia após a indução da EAE em animais *WT* corados com H&E revelam um intenso infiltrado de células em relação aos animais não doentes que foi diminuído aos níveis do controle após os diferentes tratamentos com o *Tnp*. Observamos ainda na Figura 13A que os animais *KO* tratados com o *Tnp* continuaram apresentando diminuído infiltrado de células que não foi revertido pela ausência de IL-10. O mesmo fenômeno foi observado na supressão da desmielinização induzida pelo *Tnp* nos animais *WT* e *KO* (Fig. 12B e Fig. 13B). Assim, o *Tnp*

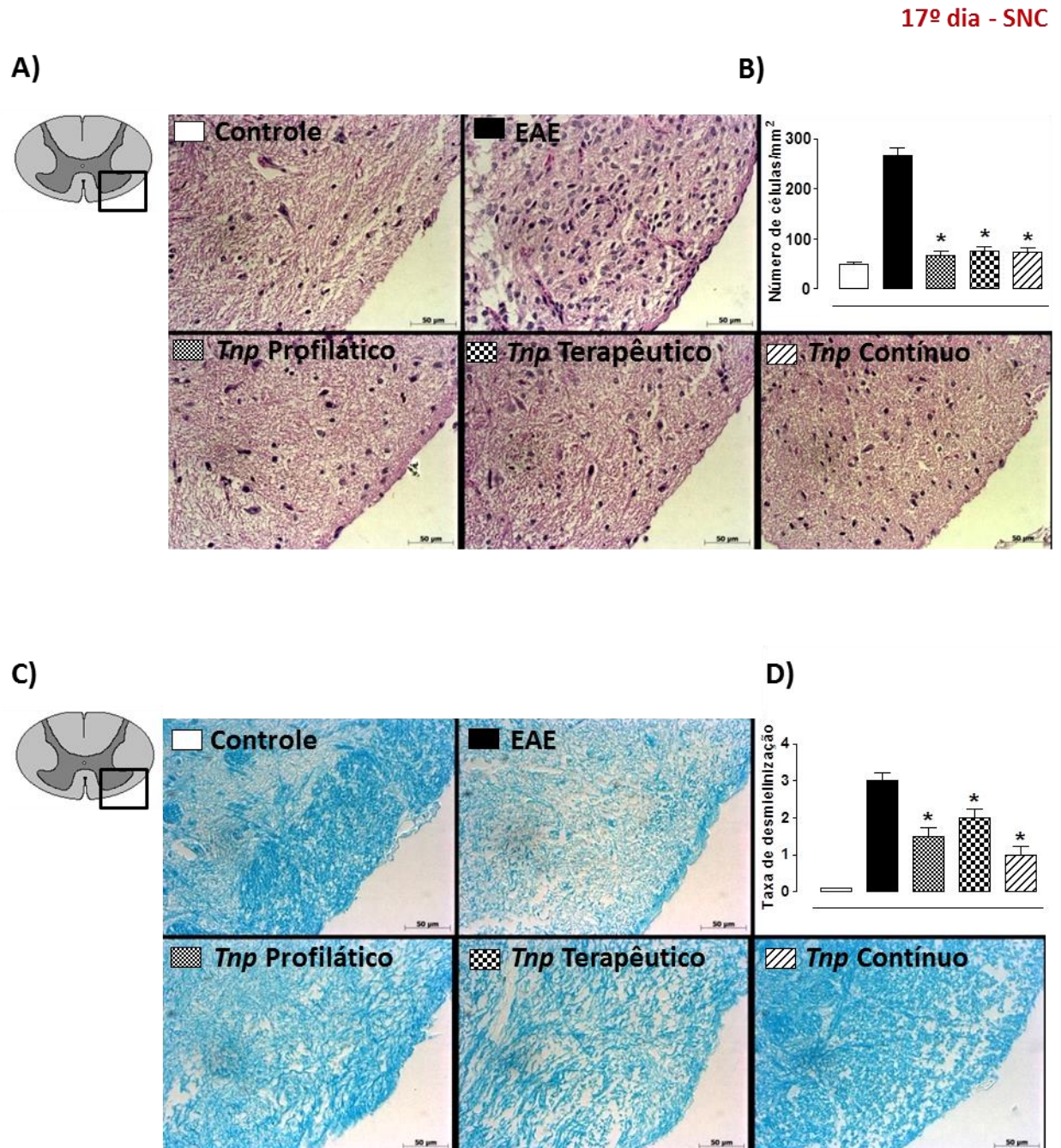
independente da citocina IL-10 suprime o infiltrado inflamatório e a desmielinização no cordão espinhal, um importante órgão alvo na EAE.

Figura 11. O *Tnp* minimiza o infiltrado celular no SNC de animais induzidos a EAE independente de IL-10 no pico da doença



Fêmeas *WT* ou *IL-10 KO* induzidas a EAE ativamente tratadas ou não com 3 mg/Kg do peptídeo *Tnp* nos esquemas: Profilático (0-9 dias), Terapêutico (10-19 dias) ou Contínuo (0-19 dias) foram mortas após 17 ou 30 dias da imunização e tiveram os cérebros (**A** e **B**) ou os cordões espinhais (**C** e **D**) coletados para obtenção de suspensão celular que foi avaliada quanto ao número total de células usando a Câmara de Neubauer. Cada barra representa a media do numero absoluto de células dos diferentes grupos acrescidos do desvio-padrão. * $p < 0,05$ em relação ao grupo EAE tratado apenas com salina 0,9% e # $p < 0,05$ indicativo da dependência de IL-10 em relação ao grupo de animais *WT* com EAE tratados com *Tnp*.

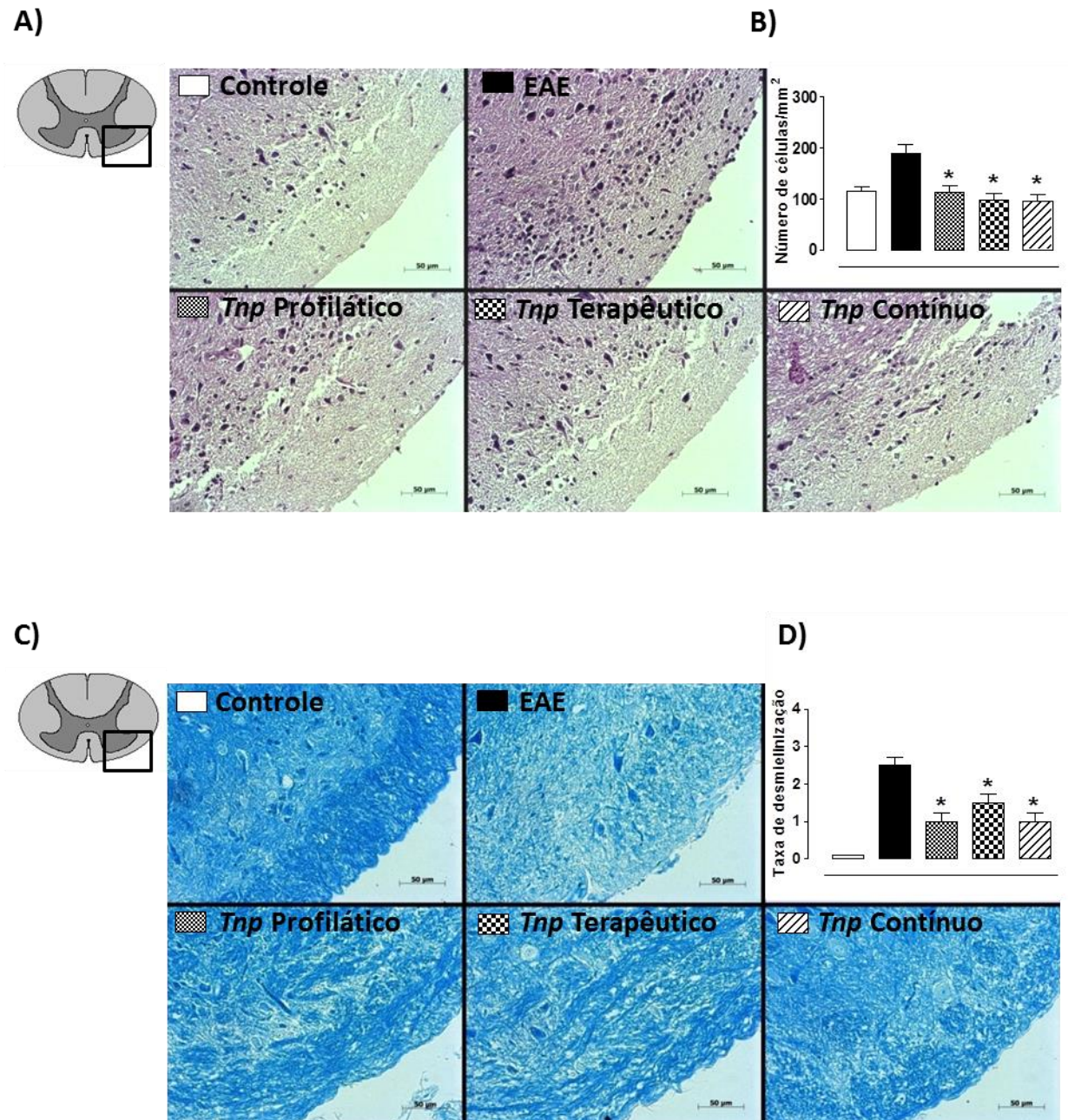
Figura 12. O *Tnp* diminui o número de leucócitos e a desmielinização do SNC de animais *WT* induzidos a EAE



Fêmeas *WT* induzidas a EAE ativamente tratadas ou não com 3 mg/Kg do peptídeo *Tnp* nos esquemas: Profilático (0-9 dias), Terapêutico (10-19 dias) ou Contínuo (0-19 dias) foram mortas após 17 dias da imunização e tiveram os cordões espinhais coletados para processamento histológico. Os cortes histológicos foram corados com H&E para análise do influxo de leucócitos e contagem por mm² (**A** e **B**) ou com *Luxol Fast Blue* para análise do conteúdo de mielina. A taxa de desmielinização foi avaliada de modo cego de acordo com os seguintes critérios: 0_Ausência de desmielinização; 1_Raros focos de desmielinização; 2_Poucas áreas de desmielinização e 3_áreas confluentes de desmielinização (**C** e **D**). Cortes histológicos representativos são mostrados. **p* < 0,05 em relação ao grupo EAE tratados apenas com salina 0,9%.

Figura 13. A diminuição do infiltrado celular e da desmielinização induzida pelo *Tnp* é independente de IL-10

17º dia - SNC



Fêmeas IL-10 KO induzidas a EAE ativamente tratadas ou não com 3 mg/kg do peptídeo *Tnp* nos esquemas: Profilático (0-9 dias), Terapêutico (10-19 dias) ou Contínuo (0-19 dias) foram mortas após 17 dias da imunização e tiveram os cordões espinhais coletados para processamento histológico. Os cortes histológicos foram corados com H&E para análise do influxo de leucócitos e contagem por mm² (A e B) ou com Luxol Fast Blue para análise do conteúdo de mielina. A taxa de desmielinização foi avaliada de modo cego de acordo com os seguintes critérios: 0_Ausência de desmielinização; 1_Raros focos de desmielinização; 2_Poucas áreas de desmielinização e 3_áreas confluentes de desmielinização (C e D). Cortes histológicos representativos são mostrados. **p* < 0,05 em relação ao grupo EAE tratados apenas com salina 0,9%.

5.8 A diminuição da atividade de MMP-9 induzida pelo tratamento com o *Tnp* profilático depende de IL-10

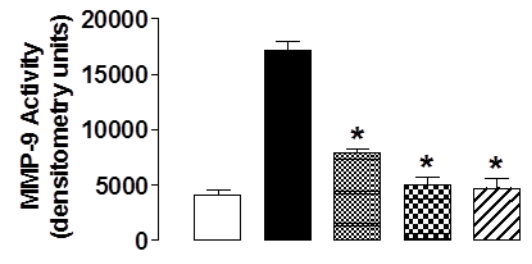
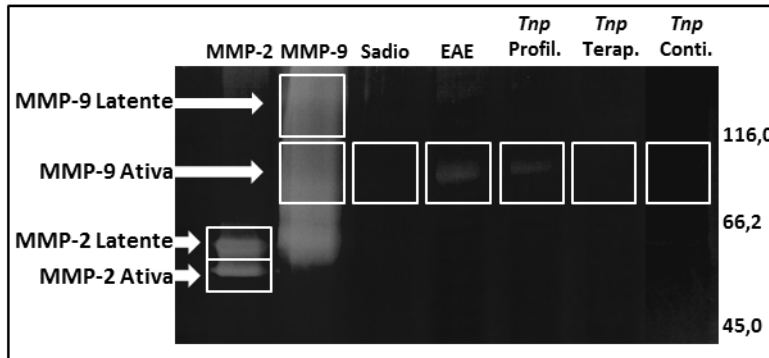
Para que os leucócitos ganhem acesso ao SNC, além da adesão focal ao endotélio mediado por moléculas de adesão e quimiocinas, a membrana basal precisa ser degradada por metaloproteinases (MMP) para que os leucócitos alcancem o tecido alvo (HU et al., 2007). A MMP-2 e particularmente a MMP-9 tem sido implicadas na ruptura da barreira hemato-encefálica (BHE) em várias doenças inflamatórias do SNC, inclusive na esclerose múltipla (YONG et al., 2005). Neste sentido, optamos por avaliar se o *Tnp* seria capaz de inibir a produção e/ou a ativação destas MMP no cérebro ou no cordão espinhal dos animais induzidos a EAE.

Nossos resultados mostram que em animais *WT* o tratamento profilático com o *Tnp* foi capaz de diminuir parcialmente a produção de MMP-9 ativa quando comparada ao animal doente tratado apenas com salina 0,9%, enquanto os tratamentos terapêutico e contínuo com o *Tnp* manteve a atividade da MMP-9 indetectável no cordão espinhal no 17º dia, semelhante aos animais controle (Fig. **14A**). O uso de animais IL-10 *KO* nos permitiu verificar que a supressão da ativação de MMP-9 durante o tratamento profilático com o *Tnp* depende da citocina IL-10, enquanto o efeito induzido pelos tratamentos terapêutico e contínuo com o *Tnp* independe da citocina IL-10, pois estes animais continuaram apresentando diminuição na atividade da MMP-9 mesmo na ausência de IL-10 (Fig. **14B**). A MMP-2, bem como a MMP-9 no cérebro no 17º e 30º dia não foram detectadas em nenhum grupo experimental (dados não mostrados). Em conjunto, um dos mecanismos pelo quais o *Tnp* previne o influxo de leucócitos no SNC é a capacidade de inibir a produção e/ou ativação da MMP-9 no cordão espinhal, uma vez que as MMP são essenciais para o processo de transmigração pela BHE.

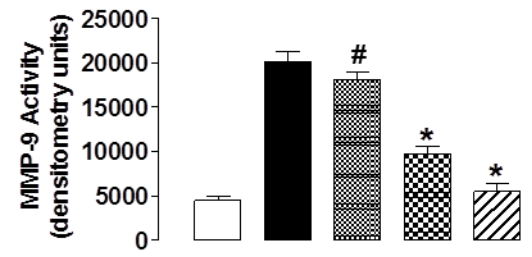
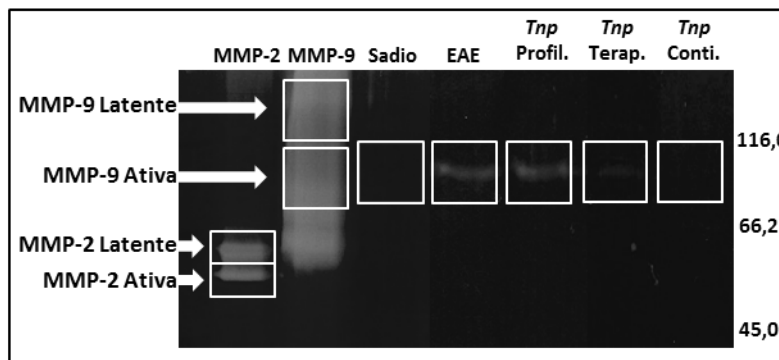
Figura 14. A diminuição da atividade de MMP-9 induzida pelo *Tnp* profilático depende de IL-10

17º dia - SNC

A) WT



B) IL-10 KO



Cordões espinhais coletados após 17 dias de fêmeas *WT* ou *IL-10 KO* induzidas a EAE ativamente tratadas ou não com o *Tnp* nos distintos esquemas terapêuticos foram processados e submetidos a eletroforese em gel a 10% de SDS-PAGE adicionada de 1 mg/mL de gelatina tipo A. O gel foi então lavado, incubado em tampão de desenvolvimento, corados com Azul de Coomassie e descorados com solução de ácido acético. A proteólise foi detectada pela visualização de bandas claras num fundo escuro. Os controles positivos incluem MMP-2 e MMP-9 recombinantes. Os géis foram escaneados e convertidos em escala de preto e branco no Adobe Photoshop para que a intensidade das bandas fossem quantificadas pelo programa ImageJ. Os resultados são expressos como unidades de densitometria (UD) em gráfico de barras. * $p < 0,05$ em relação ao grupo EAE tratado apenas com salina 0,9% e # $p < 0,05$ indicativo da dependência de IL-10 em relação ao grupo de animais *WT* com EAE tratados com *Tnp*.

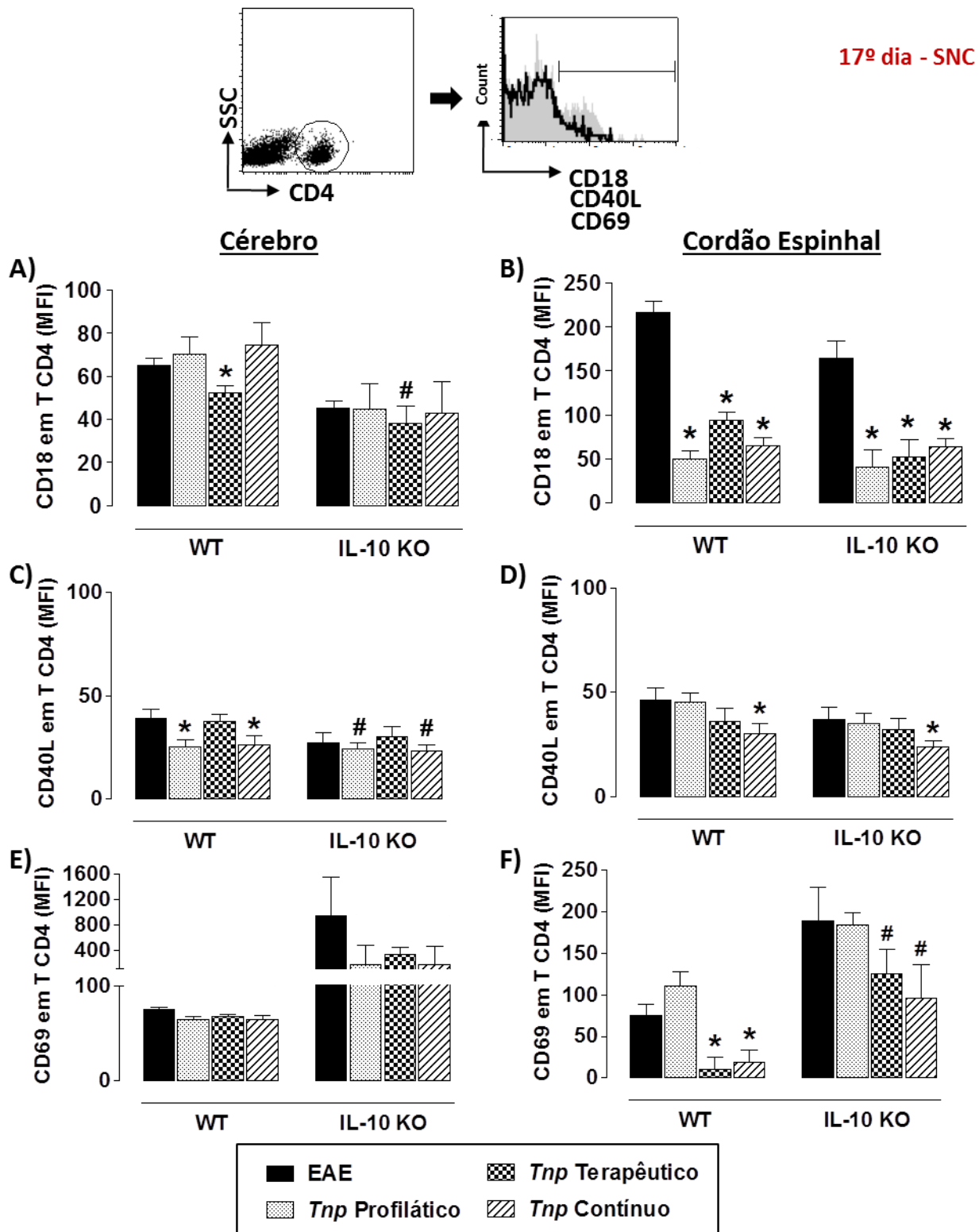
5.9 O tratamento com o *Tnp* modula o estado de ativação dos linfócitos T CD4^{pos} no SNC parcialmente via IL-10

A manutenção de linfócitos T CD4^{pos} auto-reativos no SNC é crucial para a progressão da EAE. No SNC, as células T reconhecem o antígeno específico expresso nas APC e são reativadas. Este fenômeno de reativação implica na expressão de moléculas coestimuladoras como o CD40L e o CD69. Portanto, compostos que sejam capazes de suprimir importantes moléculas para a chegada dos linfócitos T CD4^{pos} no SNC como o CD18, e moléculas coestimuladoras nos linfócitos T auto-reativos se tornam importantes para o controle da doença. Neste sentido, avaliamos se o tratamento com o *Tnp* poderia interferir no nível de expressão de CD18, CD40L e CD69 nos linfócitos T CD4^{pos} do cérebro e do cordão espinhal de animais induzidos a EAE, bem como avaliar o papel da IL-10 neste processo.

No cérebro observamos que o tratamento terapêutico com o *Tnp* induziu a diminuição na expressão de CD18 (Fig. **15A**) e que os tratamentos profilático e contínuo inibiram a expressão de CD40L (Fig. **15C**) em linfócitos T CD4^{pos}, de maneira dependente de IL-10, uma vez que estes efeitos foram abolidos em animais deficientes de IL-10. Quanto à análise da expressão de CD69 em linfócitos T CD4^{pos} não observamos diferenças entre os grupos (Fig. **15E**).

No cordão, a inibição da expressão de CD18 induzida pelos 3 tratamentos com o *Tnp* (Fig. **15B**), e a inibição da expressão de CD40L (Fig. **15D**) em linfócitos T CD4^{pos} pelo tratamento contínuo foi independente de IL-10. Porém, o tratamento com o *Tnp* na forma terapêutica ou continuada foi mediado pela IL-10 na supressão de CD69 em linfócitos T CD4^{pos}, pois como se observa na Figura **15F** os animais IL-10 *KO* não foram capazes de suprimir a expressão desta molécula nos linfócitos. Estes resultados indicam que o tratamento com o *Tnp* parcialmente via IL-10 não apenas suprime o CD18 no cordão espinhal, minimizando a chegada das células TCD4^{pos} no SNC, mas também diminui a expressão de moléculas coestimuladoras como CD40L e CD69, tornando os linfócitos T menos auto-reativos no SNC.

Figura 15. O *Tnp* modula o estado de ativação de linfócitos T CD4^{pos} no SNC parcialmente via IL-10



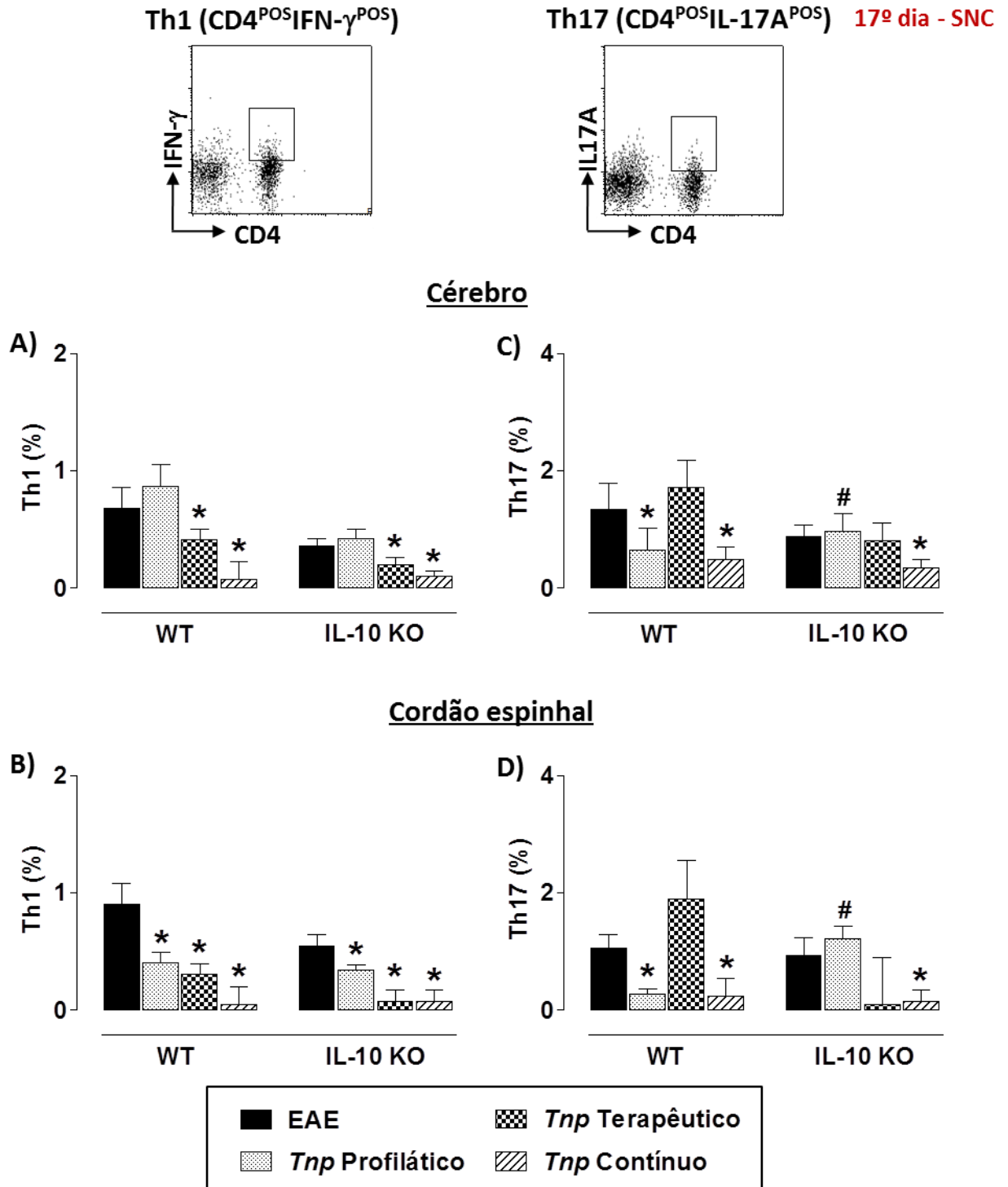
Fêmeas WT ou IL-10 KO induzidas a EAE ativamente tratadas ou não com 3 mg/Kg do peptídeo *Tnp* nos esquemas: Profilático (0-9 dias), Terapêutico (10-19 dias) ou Contínuo (0-19 dias) foram mortas após 17 dias da imunização e tiveram os cérebros (A, C e E) ou os cordões espinhais (B, D e F) coletados para obtenção de suspensão celular e determinação por citometria de fluxo do estado de ativação de células T CD4^{pos} pela expressão de CD18 (A e B), CD40L (C e D) ou de CD69 (E e F). Cada barra representa valores de MFI acrescidos do desvio-padrão. * $p < 0,05$ em relação ao grupo EAE tratado apenas com salina 0,9% e # $p < 0,05$ indicativo da dependência de IL-10 em relação ao grupo de animais WT com EAE tratados com *Tnp*.

5.10 A diminuição de linfócitos Th1 induzida pelo *Tnp* independe de IL-10 enquanto a diminuição de Th17 no SNC é parcialmente dependente

As células Th1 que produzem IFN- γ foram durante muitos anos consideradas os linfócitos T CD4^{pos} patogênicos na EAE. Entretanto, desde a descoberta do novo subtipo de linfócito T CD4^{pos} produtores de IL-17, as Th17, as pesquisas demonstram a cooperação sinérgica de ambos os subtipos na patogênese da doença (COX et al., 2008). Assim, avaliamos se o *Tnp* seria capaz de modular a polarização de clones de linfócitos T CD4^{pos} no SNC de animais induzidos a EAE.

O efeito do *Tnp* na diminuição de células Th1 em animais *WT* pôde ser observado durante o tratamento terapêutico (42%) e contínuo (80%) no cérebro (Fig. **16A**) e durante os tratamentos profilático (55%), terapêutico (67%) e contínuo (80%) no cordão espinhal (Fig. **16B**), os quais não foram revertidos nos animais IL-10 *KO* tratados, demonstrando a independência de IL-10 neste efeito. Quanto à modulação de clones Th17 pelo *Tnp*, o tratamento profilático dependente de IL-10 e o tratamento contínuo independente de IL-10 foi capaz de diminuir a população destes no cérebro (45% e 50%, respectivamente) (Fig. **16C**) e no cordão espinhal (60% e 60%), (Fig. **16D**). Vale ressaltar que os 3 tratamentos com o *Tnp* são capazes de minimizar a população de linfócitos Th1 patogênicos no SNC, porem a diminuição de clones Th17 somente foi induzida pelos tratamentos profiláticos e contínuo, mas não pelo tratamento terapêutico.

Figura 16. A diminuição de linfócitos Th1 induzida pelo *Tnp* independe de IL-10 enquanto a diminuição de Th17 patogênicos no SNC é parcialmente via IL-10



Fêmeas WT ou IL-10 KO induzidas a EAE ativamente tratadas ou não com 3 mg/Kg do peptídeo *Tnp* nos esquemas: Profilático (0-9 dias), Terapêutico (10-19 dias) ou Contínuo (0-19 dias) foram mortas após 17 dias da imunização e tiveram os cérebros (A, C) ou os cordões espinhais (B, D) coletados para obtenção de suspensão celular e determinação por citometria de fluxo da porcentagem dos diferentes subtipos de linfócitos T CD4, como Th1 (A, B) ou Th17 (C, D). Cada barra representa a media das porcentagens dos diferentes grupos acrescidos do desvio-padrão * $p < 0,05$ em relação ao grupo EAE tratado apenas com salina 0,9% e # $p < 0,05$ indicativo da dependência de IL-10 em relação ao grupo de animais WT com EAE tratados com *Tnp*.

5.11 O *Tnp* gera linfócitos T reguladores no SNC dependente de IL-10

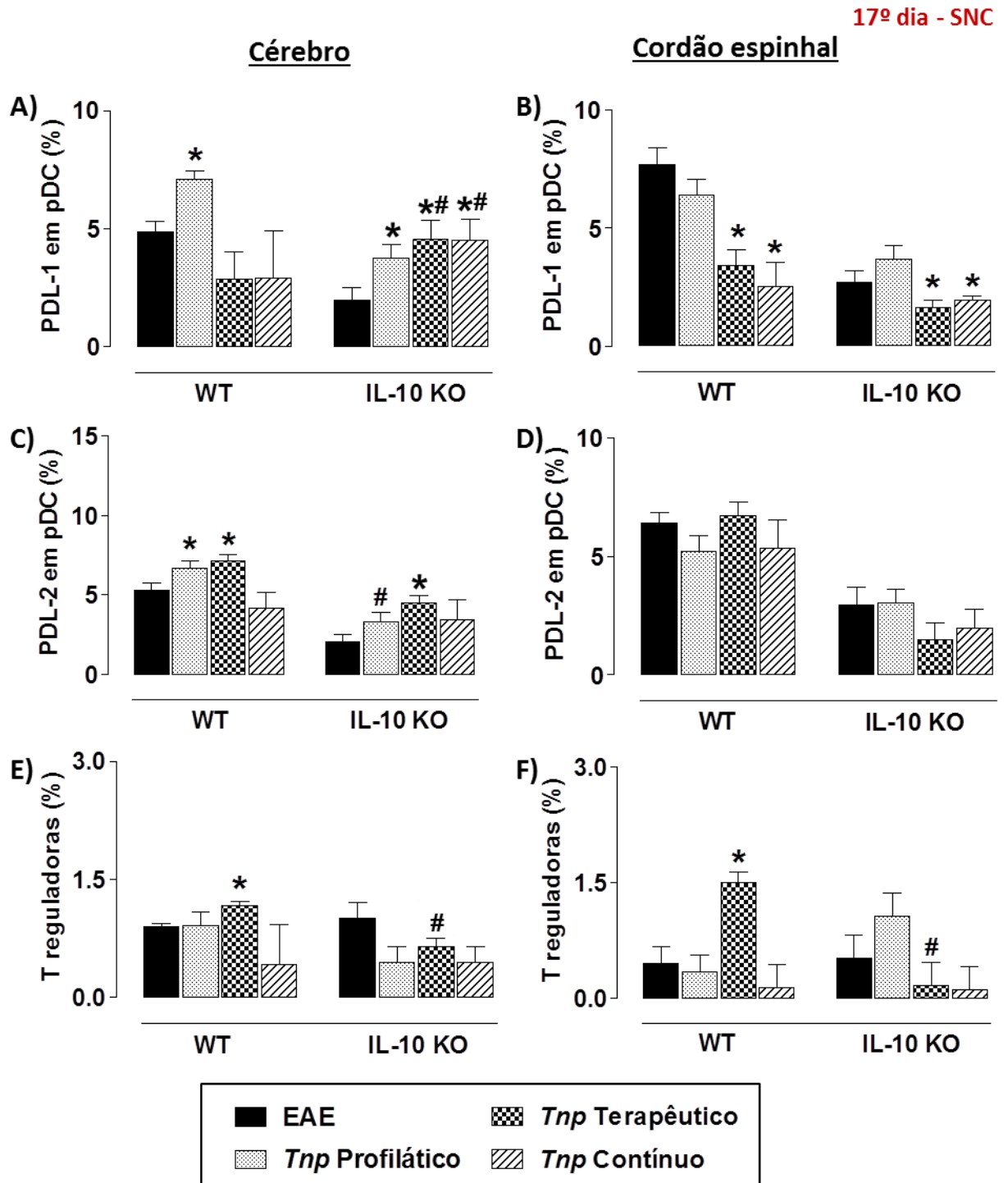
Não há dúvidas de que as células reguladoras são essenciais para o controle da neuroinflamação na EAE. Embora o número de DC no SNC seja pequeno, estas células tendem a induzir supressão ao invés de ativação. Já as Treg migram para o SNC durante a EAE para exercer seus mecanismos imunossupressores *in situ*. Diante da importância de regulação imune no tecido alvo, avaliamos a capacidade do *Tnp* em favorecer o surgimento de células reguladoras como pDC e Treg no SNC, tecido alvo na EAE.

Nossos resultados do cérebro durante o pico da doença (17^o dia) mostram que o tratamento profilático com o *Tnp* aumentou de 4,9% para 7,0% a porcentagem de pDC que expressam o PDL-1 de maneira independente da citocina IL-10, uma vez que o *Tnp* conseguiu reproduzir tal efeito em animais deficientes desta citocina (Fig. **17A**). Quanto à população de pDC que expressam o PDL-2 no cérebro, os tratamentos profilático e terapêutico com o *Tnp* foram capazes de induzir aumento de 5,3% para 6,7% e para 7,1%, respectivamente. Este efeito induzido pelo *Tnp* sobre a expressão de PDL-2 em pDC ocorreu de maneira dependente de IL-10 no tratamento profilático e independente desta citocina no tratamento terapêutico (Fig. **17C**). Ainda observamos que apenas o tratamento terapêutico com o *Tnp* foi capaz de aumentar a porcentagem da população de células Treg (de 0,8% para 1,2%) e que este efeito é totalmente dependente de IL-10 (Fig. **17E**).

No cordão espinhal, ao contrário houve uma diminuição na porcentagem de pDC que expressam a molécula PDL-1 no tratamento terapêutico e contínuo com o *Tnp* (56% e 65%, respectivamente) no 17^o dia sem o requerimento da citocina IL-10 (Fig. **17B**). Também observamos que não houve alteração da expressão de PDL-2 na população de pDC no pico da doença (17^o dia) em resposta ao *Tnp* em todos os grupos (Fig. **17D**). Quanto às células Treg, observamos que somente o tratamento terapêutico com o *Tnp* gerou estas células no cordão espinhal de maneira dependente de IL-10 (Fig. **17F**).

De modo geral, nossos resultados mostram que o *Tnp* via IL-10 é capaz de aumentar a população de células reguladoras no cérebro e no cordão espinhal dos animais induzidos a EAE. E ainda, mesmo com a doença em curso o tratamento terapêutico com o *Tnp* é capaz de gerar células Treg no SNC.

Figura 17. O *Tnp* gera linfócitos T reguladores no SNC de animais induzidos a EAE via IL-10



Fêmeas *WT* ou *IL-10 KO* induzidas a EAE ativamente tratadas ou não com 3 mg/Kg do peptídeo *Tnp* nos esquemas: Profilático (0-9 dias), Terapêutico (10-19 dias) ou Contínuo (0-19 dias) foram mortas após 17 dias da imunização e tiveram os cérebros (A, C) ou os cordões espinhais (B, D) coletados para obtenção de suspensão celular e determinação por citometria de fluxo da porcentagem dos diferentes subtipos de células reguladoras, como dendríticas plasmocitóides (A-D) ou T reguladoras (E e F). Cada barra representa a media das porcentagens dos diferentes grupos acrescidos do desvio-padrão. * $p < 0,05$ em relação ao grupo EAE tratado apenas com salina 0,9% e # $p < 0,05$ indicativo da dependência de IL-10 em relação ao grupo de animais *WT* com EAE tratados com *Tnp*.

5.12 O *Tnp* impede a expansão de células da microglia e inibe o infiltrado de macrófagos no SNC

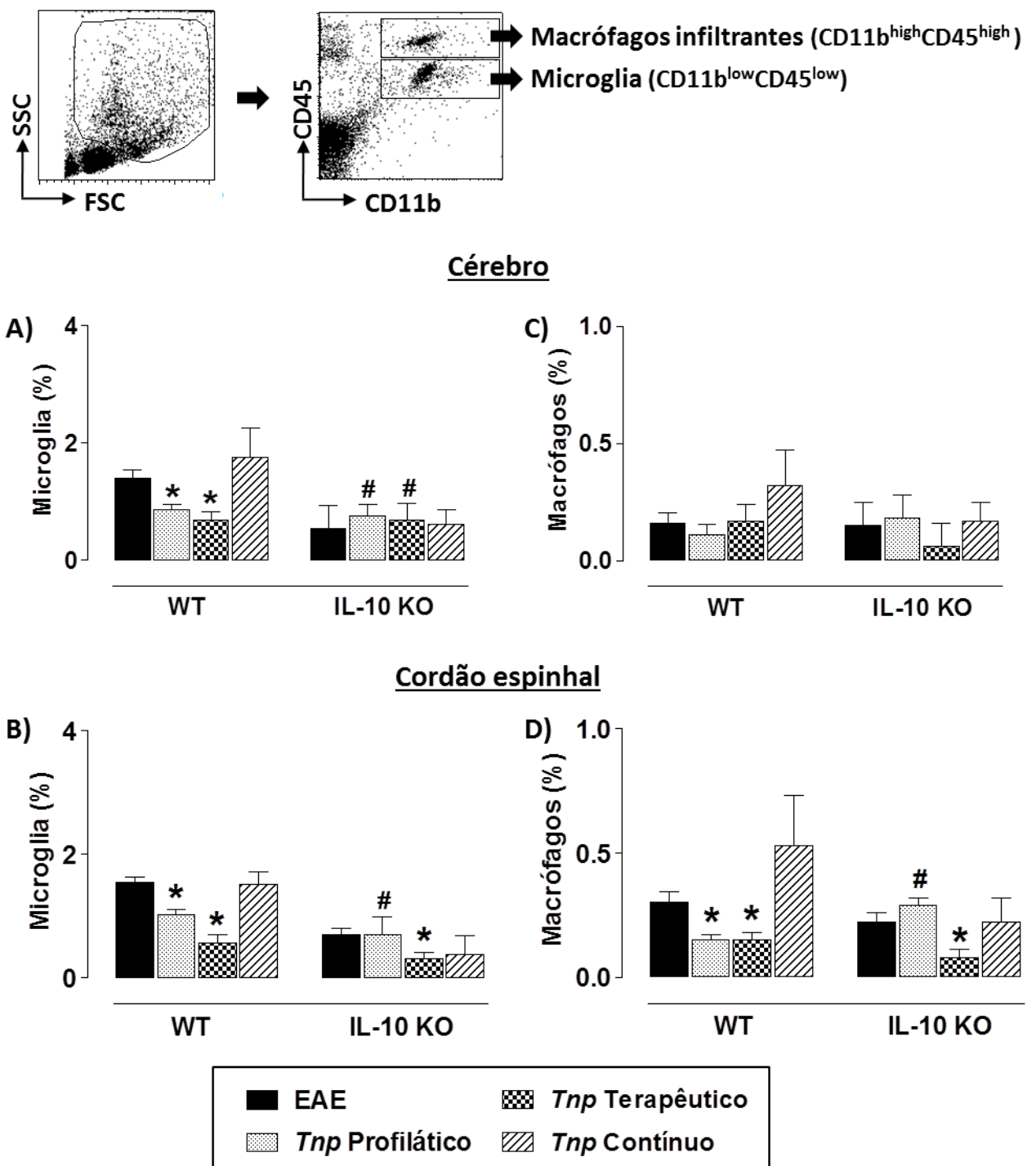
Células da microglia ($CD11b^{low}CD45^{low}$) bem como a presença de macrófagos ($CD11b^{high}CD45^{high}$) no SNC cooperam para a destruição da barreira de mielina via a indução da liberação de mediadores inflamatórios como radicais livres, intermediários reativos de oxigênio, óxido nítrico e MMP (BENVENISTE, 1997). Neste sentido, avaliamos se o *Tnp* é capaz de modular estas células no SNC, bem como a dependência de IL-10 neste processo. Para isto, avaliamos a porcentagem de microglia e de macrófagos no cérebro ou no cordão espinhal dos animais induzidos a EAE e tratados no pico da doença (17º dia) ou durante a fase crônica (30º dia).

Na Figura **18** observamos que o *Tnp* aplicado no regime profilático ou terapêutico conseguiu diminuir a expansão de células da microglia no pico da doença (17º dia) tanto no cérebro (39% e 47%, respectivamente - Fig. **18A**) quanto no cordão espinhal (33% e 60%, respectivamente - Fig. **18B**), e este efeito modulador foi dependente de IL-10 no cérebro, com exceção do tratamento terapêutico no cordão que independe da ação desta citocina. Também observamos uma diminuição do infiltrado de macrófagos no cordão espinhal nos animais *WT* tratados com o *Tnp* aplicado no regime profilático e terapêutico (50% e 49%, respectivamente). Pelo uso de animais deficientes de IL-10 podemos observar que apenas o tratamento profilático com o *Tnp* requer a participação de IL-10 para controlar a população de macrófagos no cordão espinhal (Fig. **18D**).

Em seguida observamos que no 30º dia do curso da doença a inibição da expansão de microglia (65%) ou o infiltrado de macrófagos (60%) no cérebro pelo tratamento contínuo com o *Tnp* requer a mediação da citocina IL-10 (Fig. **19A** e Fig. **19C**). No cordão espinhal, ambos os tratamentos terapêutico e contínuo também suprimiram as células da microglia (65% e 80%, respectivamente) e os macrófagos (42% e 57%, respectivamente). Pelo uso de animais deficientes de IL-10 observamos que a diminuição da microglia induzida pelo *Tnp* é dependente da ação de IL-10 (Fig. **19B**) enquanto a diminuição induzida pelo tratamento terapêutico independe de IL-10 para mediar seus efeitos (Fig. **19D**). Em conjunto, o *Tnp* impede a expansão de células da microglia e inibe o infiltrado de macrófagos no SNC parcialmente via IL-10.

Figura 18. O *Tnp* diminui a microglia ou o infiltrado de macrófagos no SNC de animais induzidos a EAE no pico da doença

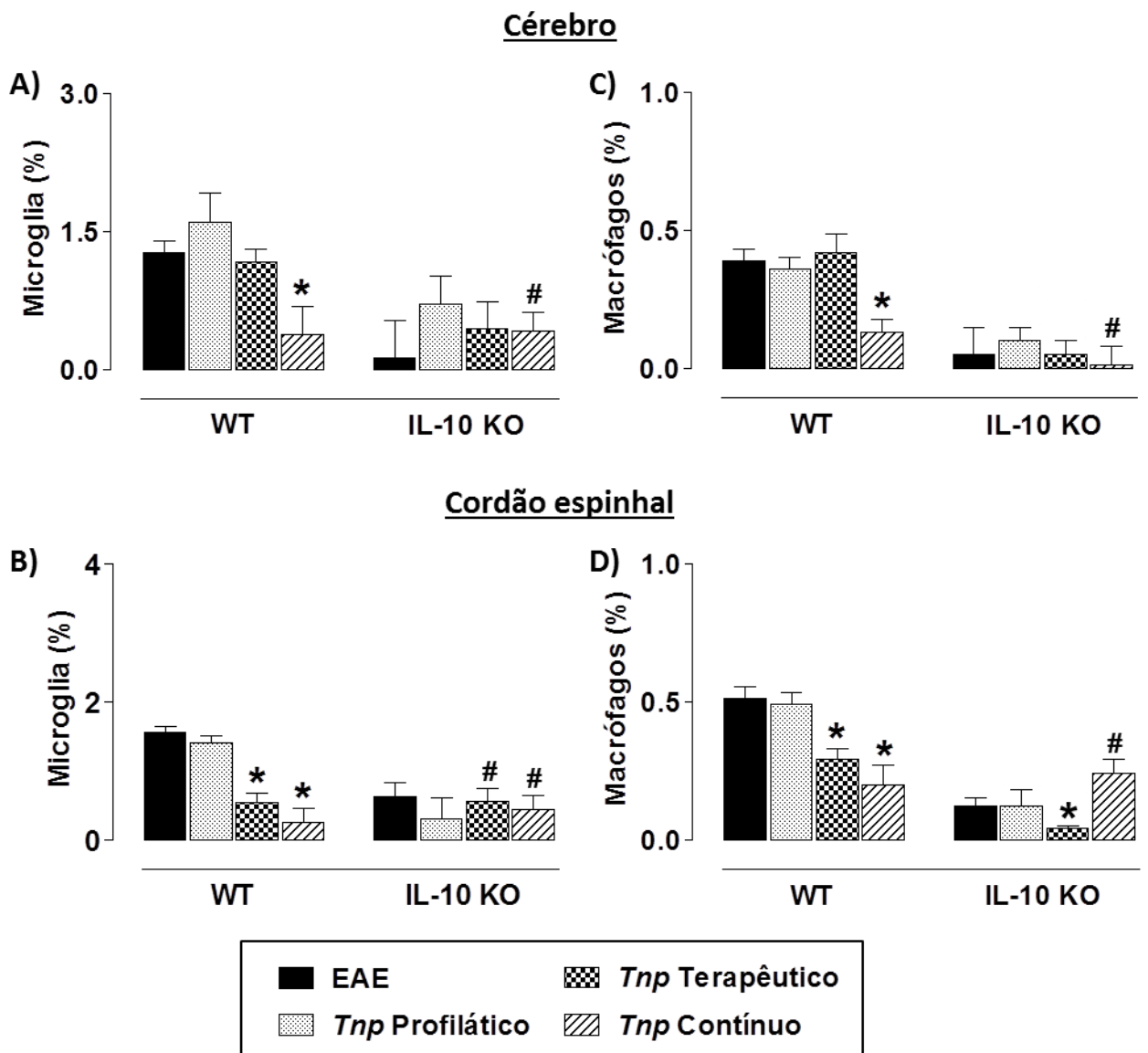
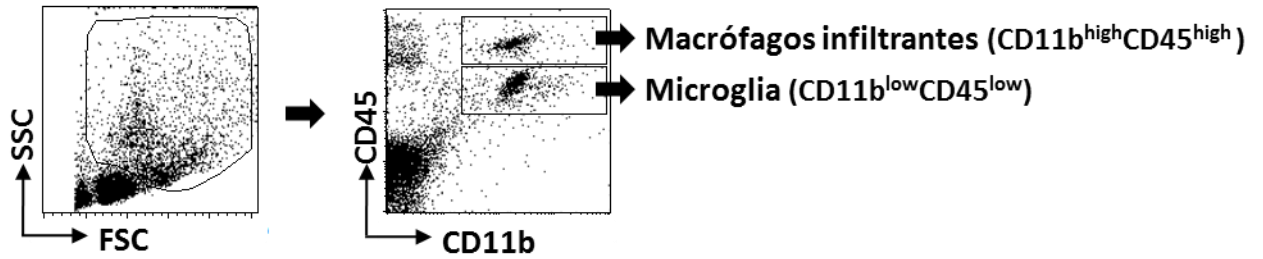
17º dia - SNC



Fêmeas WT ou IL-10 KO induzidas a EAE ativamente tratadas ou não com 3 mg/Kg do peptídeo *Tnp* nos esquemas: Profilático (0-9 dias), Terapêutico (10-19 dias) ou Contínuo (0-19 dias) foram mortas após 17 dias da imunização e tiveram os cérebros (A, C) ou os cordões espinhais (B, D) coletados para obtenção de suspensão celular e determinação por citometria de fluxo da porcentagem de células da Microglia (A e B) ou de Macrófagos infiltrantes (C e D). Cada barra representa a media das porcentagens dos diferentes grupos acrescidos do desvio-padrão. * $p < 0,05$ em relação ao grupo EAE tratado apenas com salina 0,9% e # $p < 0,05$ indicativo da dependência de IL-10 em relação ao grupo de animais WT com EAE tratados com *Tnp*.

Figura 19. O *Tnp* diminui a microglia ou o infiltrado de macrófagos no cordão espinhal de animais induzidos a EAE na fase crônica da doença

30º dia - SNC



Fêmeas WT ou IL-10 KO induzidas a EAE ativamente tratadas ou não com 3 mg/Kg do peptídeo *Tnp* nos esquemas: Profilático (0-9 dias), Terapêutico (10-19 dias) ou Contínuo (0-19 dias) foram mortas após 30 dias da imunização e tiveram os cérebros (A, C) ou os cordões espinhais (B, D) coletados para obtenção de suspensão celular e determinação por citometria de fluxo da porcentagem de células da Microglia (A e B) ou de Macrófagos infiltrantes (C e D). Cada barra representa a media das porcentagens dos diferentes grupos acrescidos do desvio-padrão. * $p < 0,05$ em relação ao grupo EAE tratado apenas com salina 0,9% e # $p < 0,05$ indicativo da dependência de IL-10 em relação ao grupo de animais WT com EAE tratados com *Tnp*.

5.13 O *Tnp* é difundido, ultrapassa a BHE e alcança a substância cinzenta do SNC

Dado que o *Tnp* apresenta efeitos imunomoduladores no SNC induzindo a diminuição de células inflamatórias e linfócitos encefalitogênicos e aumentando a presença de células reguladoras, pensamos que esta modulação pode ser decorrente de um efeito sistêmico do *Tnp* nos órgãos linfoides secundários ou mesmo da ação localizada no SNC. Para elucidar esta hipótese, inicialmente avaliamos a capacidade do *Tnp* de difusão pelo organismo e de alcançar o SNC ultrapassando a BHE, após a injeção subcutânea nos animais doentes.

A BHE compreende as células endoteliais dos vasos sanguíneos do SNC em conjunto com uma membrana basal espessa e astrócitos. Ela exibe um fenótipo único, caracterizada pela presença de células endoteliais que são conectadas por um complexo de adesão intercelular. Isso forma um íntimo contato entre as células adjacentes, conhecidos como junções finas (*tight junctions*). A força de barreira da BHE é reforçada pela relativa escassez de fenestras e vesículas pinocitóticas. Coletivamente, isto resulta num baixo nível de endocitose e transcitose, que restringe severamente o movimento de moléculas e células para o SNC pela rota transcelular. Ainda, a BHE intacta é largamente impermeável a compostos não lipofílicos com peso molecular superior a 450 Da. Isto representa um grande desafio para a descoberta de medicamentos para o SNC (PALMER, 2013).

Inicialmente, o *Tnp* foi conjugado ao FITC e a eficiência da conjugação foi avaliada por espectrometria de massas. O FITC é o marcador fluorescente mais comumente usado para conjugar proteínas ou peptídeos via grupamento terminal amina. O grupamento isotiocianato do FITC reage com grupos de proteínas com terminal amino ou aminas primárias. Podemos observar na Figura **20A** o espectro de massas referente à análise do *Tnp* (1.514,8 Da) antes do acoplamento detectado pela presença dos íons múltiplos carregados (massa relativa): 759 [M + 2H]²⁺, 506 [M + 3H]³⁺, 380 [M + 4H]⁴⁺. Após o acoplamento do *Tnp* ao FITC (389,38 Da) e subtração de 1 hidrogênio, a massa esperada é de 1.902,8 detectado pela presença de íons múltiplos carregados (massa relativa): 636 [M + 3H]³⁺, 477 [M + 4H]⁴⁺ (Fig. **20B**). Uma vez confirmado o acoplamento do *Tnp*-FITC, injetamos 6 mg/Kg em um volume final de 100 µL s.c. em animais *WT* controle e induzidos a EAE no 12º dia da doença e monitoramos a fluorescência no baço e principalmente no cérebro e no cordão espinhal após 2 h da injeção. Animais controle e induzidos a EAE injetados com FITC sozinho foram utilizados como controle.

Como mostrado na Figura **21**, podemos observar que animais controle ou com EAE injetados com 1 mg/Kg de FITC sozinho (quadrante menor à direita) apresentam ausência ou baixa fluorescência no tecido esplênico, indicativo da pouquíssima perfusão e alcance de FITC no baço, um importante órgão linfóide secundário, responsável pelo desencadeamento e/ou pelo controle da

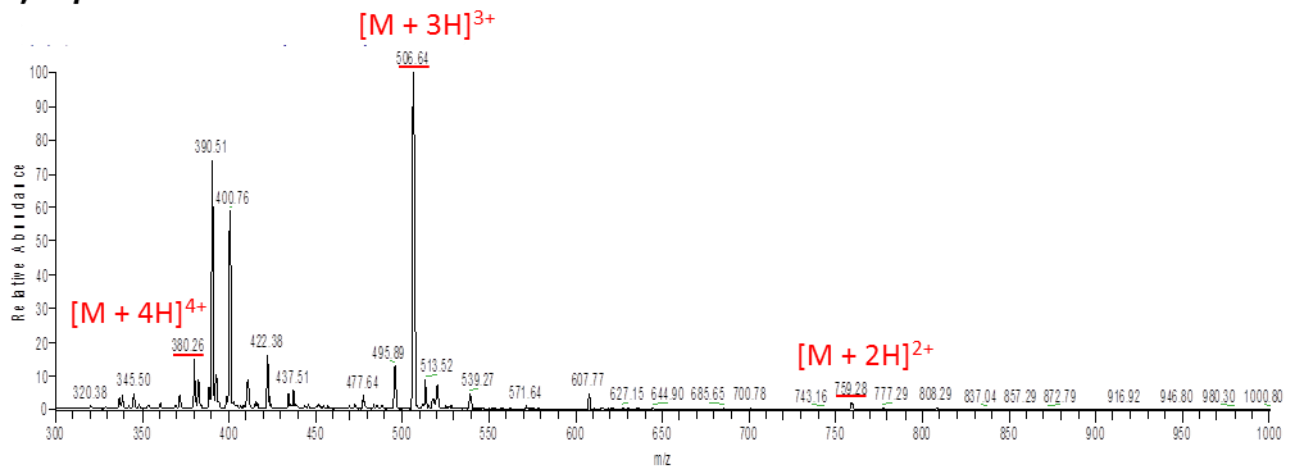
resposta imune adaptativa. Na foto maior à esquerda, observamos que tanto animais controle ou com EAE injetados com o *Tnp*-FITC apresentaram fluorescência no tecido esplênico, indicativo da recirculação do *Tnp*. Nos animais controle injetados com o *Tnp*-FITC (superior esquerda) observamos uma difusão do *Tnp* pelo interstício do órgão principalmente na região subcapsular, e ao contrário, nos animais EAE observamos a presença do *Tnp* principalmente nos centros germinativos dos folículos linfoides, local onde as células B após ativação diferenciam-se em células plasmáticas produtoras de anticorpos de alta afinidade.

Na Figura **22**, observamos que os cérebros de animais controle injetados com 1 mg/Kg de FITC sozinho (superior à direita) também não apresentaram fluorescência no tecido, indicativo da incapacidade de passagem de FITC (389 Da) pela BHE intacta (impermeável a compostos não lipofílicos e com peso molecular superior a 450 Da). Já em animais induzidos a EAE injetados com o FITC (inferior à direita), os quais apresentam a BHE rompida pela doença, ou mesmo nos animais controle injetados com o *Tnp*-FITC (superior à esquerda) uma quantidade elevada de fluorescência foi evidenciada predominantemente na região da substância branca. Diferentemente, no cérebro dos animais induzidos a EAE injetados com o *Tnp*-FITC (inferior à esquerda) observamos grande intensidade de fluorescência principalmente na região periventricular, indicando a passagem do *Tnp* para a região cinzenta do cérebro rica em oligodendrócitos produtores de mielina (LEE, 2012; RUDICK; TRAPP, 2009).

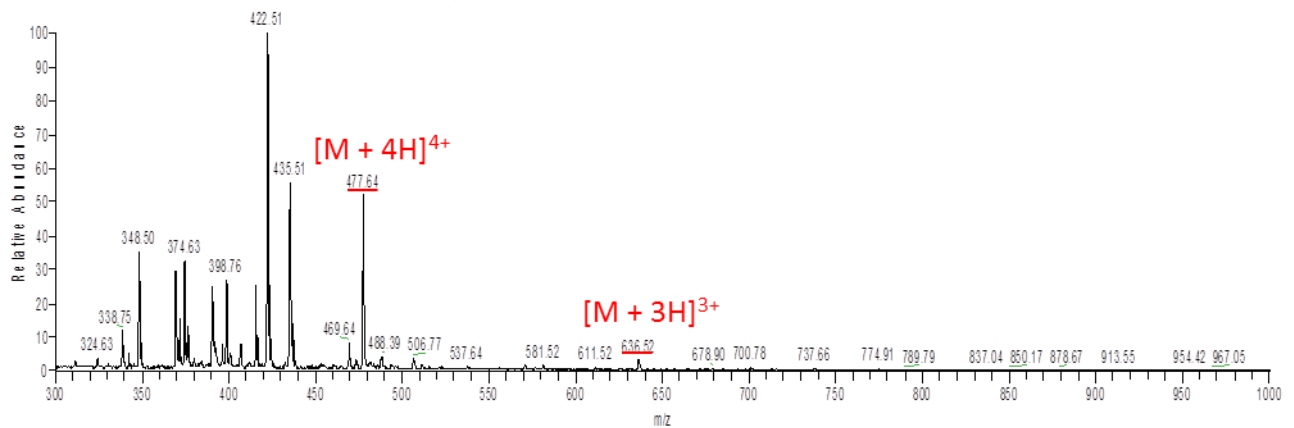
No cordão espinhal (Fig. **23**), também observamos nos animais induzidos a EAE injetados com o *Tnp*-FITC (inferior à esquerda) uma grande intensidade de fluorescência principalmente na região cinzenta perivascular, indicativo da passagem do *Tnp* para a região do cordão espinhal com degeneração de oligodendrócitos mediada pela neuroinflamação.

Figura 20. Identificação do acoplamento do *Tnp* ao FITC por espectrometria de massas

A) *Tnp*



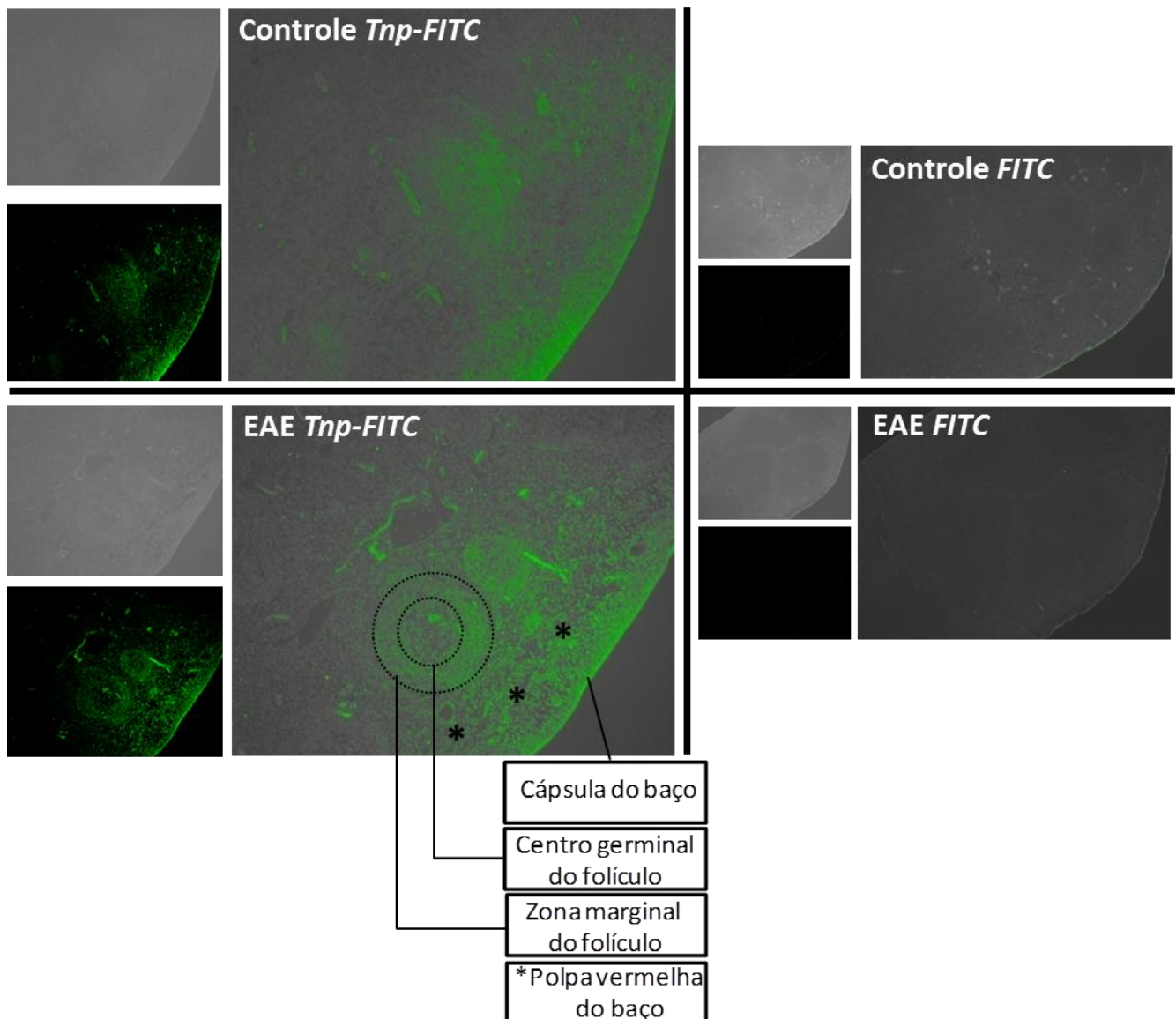
B) *Tnp* acoplado à FITC



O peptídeo *Tnp* foi incubado com FITC durante 1 h à temperatura ambiente no escuro e purificado em coluna Sep-pack. A efetividade do acoplamento foi confirmada pela análise das massas por espectrometria LCMS (Thermo) módulo positivo. **A)** Espectro de massas referente ao *Tnp* (1.514,8 Da) antes do acoplamento com o FITC, detectado pela presença de íons múltiplos carregados (massa relativa): 759 [M+2]²⁺, 506 [M+3]³⁺, 380 [M+4]⁴⁺. **B)** Espectro de massas referente ao *Tnp* após o acoplamento com o FITC (1.902,8 Da), detectado pela presença dos íons múltiplos carregados (massa relativa): 636 [M + 3H]³⁺, 477[M + 4H]⁴⁺.

Figura 21. O *Tnp*-FITC é difundido e chega ao centro germinativo dos folículos linfoides do baço de animais induzidos a EAE

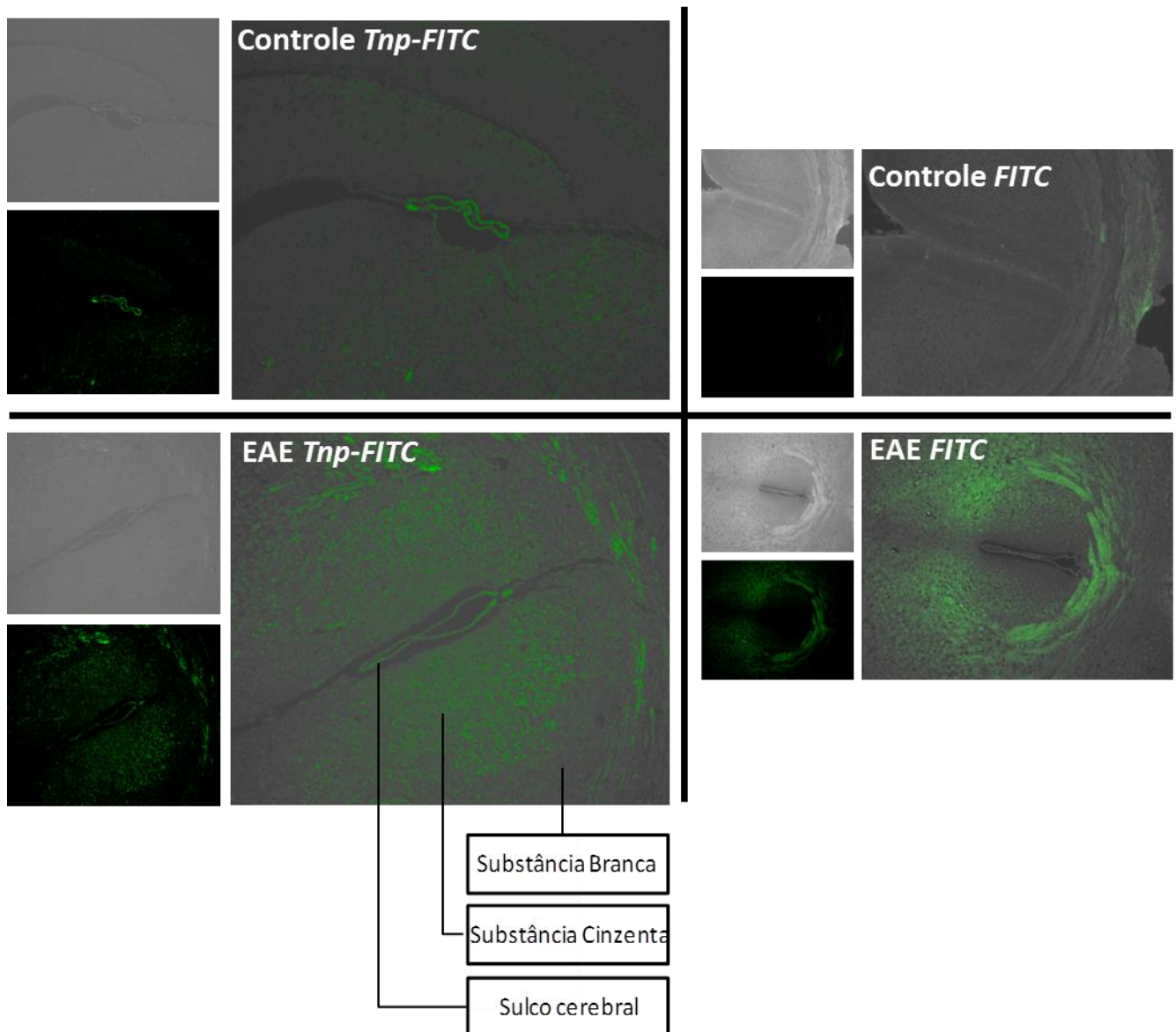
12º dia - Baço



Os baços de fêmeas C57BL/6 *WT* foram coletados no 12º dia da imunização após 2 h da injeção s.c. de 100 µL de *Tnp*-FITC a 6 mg/Kg e foram cortados, processados e avaliados em microscopia de fluorescência em objetiva de 10x. Os asteriscos indicam a região da polpa vermelha do baço. O folículo linfóide está circulado com linhas pontilhadas. Baços de animais controle ou com EAE injetados com 1 mg/Kg de FITC sozinho também foram analisados e verificou-se ausência ou baixa fluorescência no tecido esplênico, indicativo da baixa ou nenhuma perfusão de FITC.

Figura 22. O *Tnp*-FITC consegue ultrapassar a BHE e chegar à substância cinzenta do cérebro de animais induzidos a EAE

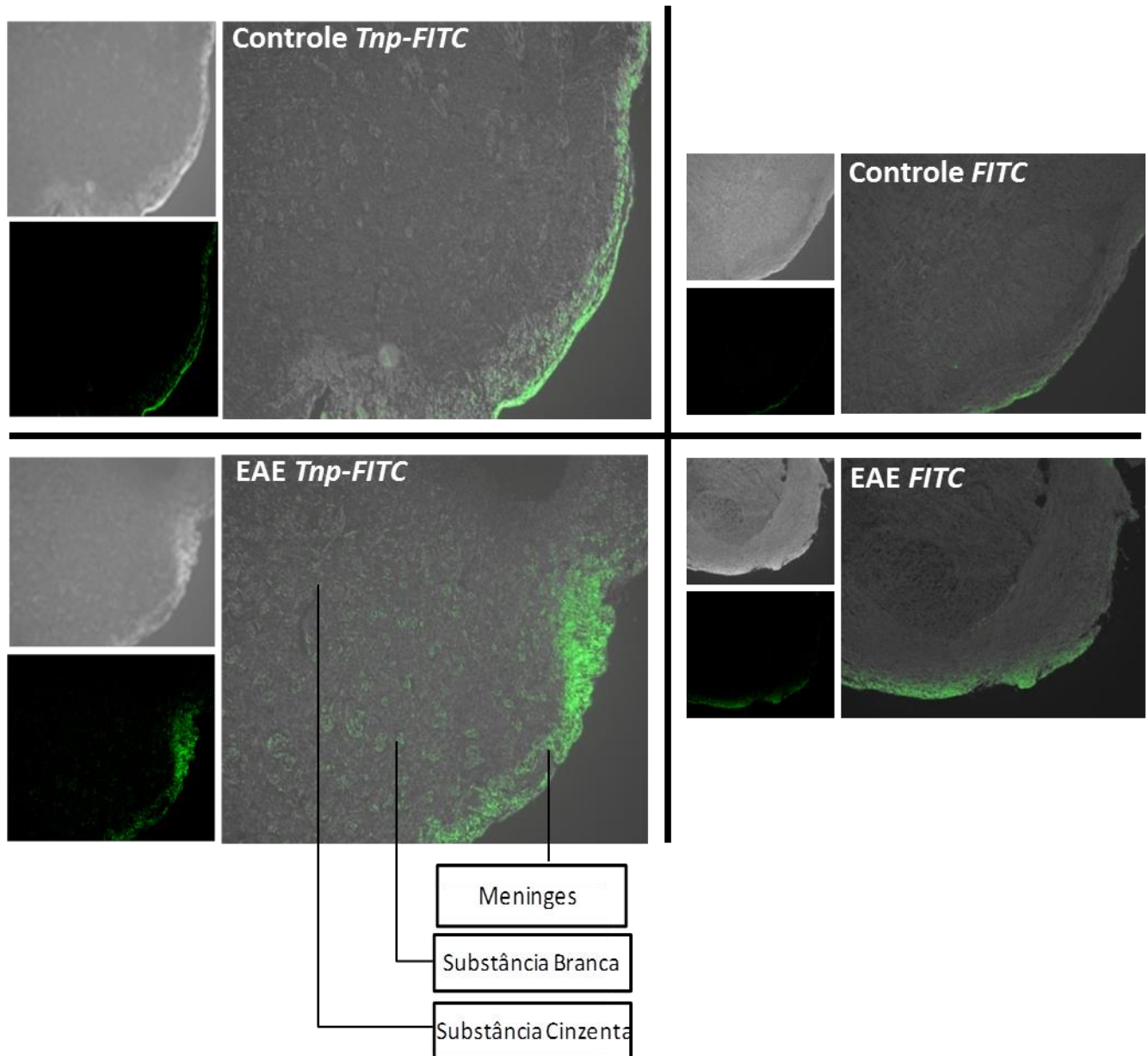
12º dia - Cérebro



Os cérebros de fêmeas C57BL/6 *WT* foram coletados no 12º dia da imunização após 2 h da injeção s.c. de 100 μ L de *Tnp*-FITC a 6 mg/Kg e foram cortados, processados e avaliados em microscopia de fluorescência em objetiva de 10x. Cérebros de animais controle injetados com 1 mg/Kg de FITC sozinho também foram analisados e não apresentaram fluorescência, indicativo da incapacidade de passagem de FITC (389 Da) pela BHE intacta.

Figura 23. O *Tnp*-FITC consegue ultrapassar a BHE e chegar à substância cinzenta do cordão espinhal de animais induzidos a EAE

12º dia - Cordão



Os cordões espinhais de fêmeas C57BL/6 *WT* foram coletados no 12º dia da imunização após 2 h da injeção s.c. de 100 μ L de *Tnp*-FITC a 6 mg/Kg e foram cortados, processados e avaliados em microscopia de fluorescência em objetiva de 10x. Cordões de animais controle injetados com 1 mg/Kg de FITC sozinho também foram analisados e apresentaram baixos níveis de fluorescência, indicativo da incapacidade de passagem de FITC (389 Da) pela BHE intacta.

6 DISCUSSÃO

A encefalomielite autoimune experimental induzida em fêmeas C57BL/6 (H-2^b) pela imunização com o peptídeo correspondente ao epítipo imunodominante da mielina (MOG₃₅₋₅₅) é caracterizada por um curso clínico crônico-progressivo com inflamação e desmielinização persistente do SNC. Optamos por utilizar este modelo por ser recomendado em medicina translacional sendo a primeira etapa para o teste de componentes terapêuticos para o tratamento da EM, permitindo intervenções profiláticas e terapêuticas (MENDEL et al., 1995; ZHANG et al., 1997). Este modelo difere de outros modelos como: MOG₁₋₁₂₅ em camundongos C57BL/6 o qual é recomendado para a avaliação preferencial de células B, ou o PLP₁₃₉₋₁₅₁ em animais SJL (H-2^s) que mesmo mimetizando melhor os pacientes com EM por apresentarem surtos e remissão é indicado apenas para tratamentos durante a fase efetora.

Os resultados descritos aqui indicam que o *Tnp*, um peptídeo cíclico derivado do veneno de *Thalassophryne nattereri*, com propriedades antiinflamatórias apresenta um elevado potencial terapêutico por ser capaz de prevenir e recuperar os sinais clínicos da EAE. Os resultados obtidos com os diferentes esquemas de tratamento com o *Tnp* (profilático, terapêutico e contínuo) confirmam a sua eficiência no controle da sintomatologia, decorrente dos efeitos localizados de linfócitos T auto-reativos e macrófagos que cruzaram a BHE oriundos dos órgãos linfóides, uma vez que todos adiaram o início do aparecimento dos sintomas mais graves (de 17 para 21, 19 e 21, respectivamente) e diminuíram a média de intensidade dos sintomas em 40%. Observamos que o tratamento profilático induziu os melhores resultados de redução da sintomatologia (média de 2,1 para 1,2) e que a melhora observada nos animais tratados continuamente com o *Tnp* resulta da ação profilática do tratamento entre os dias 0 a 9, sem ser o resultado de um efeito somatório. Este é um dado bastante promissor e reforça a importância de intervenções farmacológicas na fase inicial da doença para o controle de seu curso e implica que a ação do *Tnp* durante a fase aguda da doença é decisiva para a supressão da migração de células T encefalitogênicas para o SNC.

Ademais, além da demonstrada eficiência do *Tnp* aplicado terapêuticamente na prevenção e na recuperação dos sinais clínicos na EAE ser dependente de IL-10, demonstramos que o uso do *Tnp* de forma profilática induz o controle da neuroinflamação por mecanismos dependentes de IL-10, porém, o uso continuado do *Tnp* mantém inibida a neuroinflamação independente desta citocina. Isto mostra que a aplicação continuada do *Tnp* gera um efeito protetor sem contudo induzir imunossupressão. Uma vantagem para o *Tnp*, pois a imunossupressão juntamente com a cardiotoxicidade é um dos efeitos colaterais dos medicamentos biológicos em uso para a esclerose múltipla. A imunossupressão gera em alguns pacientes uma maior susceptibilidade para o

desenvolvimento de infecções oportunistas virais, como a leucoencefalopatia multifocal progressiva.

Bettelli e colaboradores (1998) fez as primeiras observações da importância de citocinas reguladoras no controle do desenvolvimento da EAE. Este grupo demonstrou que fêmeas C57BL/6 IL-10 KO imunizadas ativamente com MOG₃₅₋₅₅ desenvolvem uma doença crônica e persistente sem evidências de remissão. Na ausência de IL-10, relativamente mais linfócitos T auto-reativos se ativam e proliferaram em resposta ao MOG₃₅₋₅₅ com elevada produção de TNF- α e IFN- γ .

Estes autores demonstraram a importância de IL-10 na limitação da gravidade, persistência dos sintomas e progressão da doença. A IL-10 é descrita como importante na inibição da produção e na ação de citocinas pró-inflamatórias incluindo a IL-1, IL-6, IL-12, GM-CSF, M-CSF, IFN- γ , TNF- α , MIP-1 α , MIP-1 β e MIP-2 pelas células da microglia residentes e pelos macrófagos infiltrantes no SNC, os quais causam desmielinização e degeneração axonal (D'ANDREA et al., 1993; DE WAAL MALEFYT et al., 1991; MOORE et al., 1993). Além do mais, altos níveis de IL-10 mRNA e da proteína são relacionados à remissão da doença em modelos animais e em pacientes humanos tratados com IFN- β (KENNEDY et al., 1992; STUVE et al., 2002).

A completa inibição do estado de ativação das cDC induzida pelo *Tnp* é totalmente dependente de IL-10 (MHC de classe II, CD40 e CD80) e a indução de moléculas inibitórias nas pDC depende parcialmente desta citocina, sugerindo que durante a fase aguda ou de indução da EAE a transição induzida pelo *Tnp* de DC do estado imunogênico para o tolerogênico depende, porém não unicamente da ação de IL-10, podendo ser mediada por outras moléculas como TGF- β , VEGF e fatores solúveis como o ácido retinóico, glicocorticoides, IL-35 e vitamina D, que induz a polarização das DC para um perfil tolerogênico (MOSER et al., 1995; PENNA; ADORINI, 2000; STEINMAN et al., 2003; WADA et al., 2009).

A apresentação antigênica é essencial para o desencadeamento da EAE (GERMAIN, 1994) e o aumento da expressão de MHC de classe II ocorre em diversas doenças autoimunes (GREENWOOD et al., 2006). Neste sentido, moléculas de MHC de classe II são um alvo atraente para o controle de doenças autoimunes. O bloqueio da apresentação de antígenos pela administração de anticorpos específicos para MHC de classe II concomitante com o neuroantígeno durante a fase cognitiva (STEINMAN et al., 1981) ou o uso de peptídeos que se ligam ao MHC de classe II nas APC com alta afinidade (ADORINI; NAGY, 1990; LAMONT et al., 1990; WRAITH et al., 1989) foram demonstrados serem capazes de suprimir a EAE.

Esta modulação imune, caracterizada pela supressão da apresentação antigênica e moléculas coestimuladoras tem sido observada na literatura durante o tratamento com as estatinas,

sinvastatina e com a atorvastatina, compostos extensivamente testados no modelo de EAE (GREENWOOD et al., 2006; KWAK et al., 2000; YOUSSEF, et al., 2002). Neste contexto, o *Tnp* apresenta um grande potencial farmacológico, uma vez que os efeitos do tratamento profilático são observados na fase de cognição da resposta com a supressão da capacidade de apresentação de antígenos e consequente da estimulação dos linfócitos autoimunes por moléculas coestimuladoras.

A supressão de células da microglia e de macrófagos ativados no SNC, os quais são considerados as principais células efetoras envolvidas no processo de desmielinização pela liberação de diversos mediadores inflamatórios, têm sido associada à prevenção e melhoria dos sintomas na EAE (HUITINGA et al., 1993; MIYAMOTO et al., 2006). Mostramos que o *Tnp* inibe o trânsito para o SNC de macrófagos no pico da doença de maneira dependente de IL-10 (no regime profilático). A produção de IL-10 induzida pelo *Tnp* pode regular negativamente a expressão de moléculas de adesão e quimiocinas (ROMANO et al., 2000; WEITZ-SCHMIDT et al., 2001), mas também regular a diminuição da atividade de MMP (Fig. 14), as quais facilitam a ruptura da membrana basal endotelial e da matriz extracelular pelos leucócitos (BELLOSTA et al., 1998).

Ainda, nossos resultados revelam que o tratamento com o *Tnp* é capaz de minimizar a população de células da microglia por mecanismos dependentes e também independentes de IL-10, que pode estar associado primeiramente a um estado refratário deste tipo celular aos efeitos de IL-10 pela menor expressão dos receptores desta citocina (receptores IL-10R1 e IL-10R2) e em segundo lugar, ao próprio efeito direto do *Tnp* nestas células, impedindo sua ativação. A natureza do *Tnp* como um inibidor de serino-protease ajuda a melhor compreensão da modulação direta sobre a microglia, uma vez que é descrito que os inibidores de proteases BBI são capazes de alterar a via NF- κ B, iNOS/NO e COX2 (DIA et al., 2008), importantes para a função efetora de macrófagos. Resta ainda investigarmos se o *Tnp* bloqueia a liberação de ROS, NO e citocinas inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e TNF- α destes subtipos celulares.

Também é atribuído ao domínio tipo kunitz do inibidor de protease do ancilóstomo *Ancylostoma ceylanicum* (AceKI-1) a capacidade de bloquear a integrina CD11b/CD18 expressa em neutrófilos e inibir a sua migração (MILSTONI et al., 2000). Dados na literatura mostram que a proteção da EAE mediada por BBIs é completamente abolida em animais deficientes de IL-10, destacando o essencial papel desta citocina na supressão mediada por inibidores de proteases. Recentemente, evidenciou-se que as linfócitos T CD4^{POS}, mas não outras células (incluindo as APC), são a principal fonte de IL-10, induzida pelo tratamento com o BBI, mas ainda falta investigar se o BBI induz a produção de IL-10 pelas linfócitos T CD4^{POS} por ação direta, ou indiretamente por agir em APC (DAI et al., 2012).

Assim, entendemos que de maneira dependente do domínio tipo Kunitz, o *Tnp* pode agir diretamente nas células do SNC impedindo sua ativação e ainda impedir o transito de linfócitos T, pela inibição da expressão de CD18. Entendemos que o efeito do *Tnp* se manifesta distintamente (dependente, parcial ou independente de IL-10) de acordo com a fase da doença na qual o tratamento é aplicado. Dependente de IL-10, o *Tnp* age na fase indutora limitando a ativação de cDC e a consequente interação cognitiva entre linfócitos T, e de maneira parcial ou independente quando a doença já está instalada. Nesta fase o *Tnp* pode agir via sua função inibidora de protease dependente do domínio Kunitz, semelhante a outros inibidores que apresentam este domínio como a Bikunina e o TFPI (SHIGETOMI et al., 2010).

O tratamento com o *Tnp* não apenas suprime o CD18 independente da citocina IL-10 no cordão espinhal, minimizando a chegada das células TCD4^{pos} no SNC no pico da doença, mas também diminui a expressão da molécula coestimuladora CD40L (dependente no cérebro e independente no cordão) e da molécula ativadora CD69 no cordão (dependente de IL-10), tornando os linfócitos T menos auto-reativos no SNC. Dependente da citocina IL-10, o *Tnp* impede o influxo de linfócitos Th17 produtores de IL-17A para o SNC. O papel da IL-10 na supressão de CD69 tem sido demonstrado em experimentos *in vitro* onde a neutralização desta citocina com anticorpos específicos resulta no aumento da expressão de CD69 em células T (CRISPIN et al., 1998).

A supressão das células Th1 mediada pelo *Tnp* se dá independente da citocina IL-10, enquanto a supressão das células Th17 no tratamento profilático necessita da IL-10. O mecanismo pelo qual isto ocorre talvez possa estar associado à capacidade do *Tnp* em suprimir a apresentação antigênica, principalmente da molécula CD80 envolvida na ativação de células Th1. Outra forma de inibir células Th1 e Th17 seria a indução de desvio imune para Th2 com a síntese de IL-4 (MATHISEN et al., 1997; RACKE et al., 1994). Nossos resultados mostram que o *Tnp* também promove a diferenciação concomitante de linfócitos Th2, sugerindo o desvio imune como um dos mecanismos supressivos induzido pelo *Tnp*. Além disso, a supressão de clones Th17 por peptídeos sintéticos também pode ocorrer pela ação em moléculas de sinalização intracelular, uma vez que o peptídeo ORLL-NIH001 consegue se ligar ao STAT3 e inibir o fator de transcrição ROR γ t (YU et al., 2012).

O acetato de Glatiramer, medicamento de uso regular para a esclerose múltipla, previne doenças autoimunes por estimular células Treg pelo bloqueio da molécula coestimuladora CD40L (KASPER et al., 2007). Nossos resultados mostram que o *Tnp* também é capaz de aumentar a população de células T reguladoras no SNC dos animais induzidos a EAE além do seu aumento no baço. Embora o *Tnp* induza a geração de pDC (parcialmente dependente de IL-10) e de células Treg de maneira dependente de IL-10, a geração das pDC ocorre preferencialmente quando o *Tnp* é aplicado durante a fase de indução da doença, enquanto a geração das Treg ocorre também quando

ele é aplicado durante a fase efetora, sugerindo mais uma vez que mesmo com a doença em curso a aplicação terapêutica do *Tnp* induz a geração de linfócitos T reguladores produtores de IL-10, útil no controle da inflamação do SNC.

E mais, o tratamento terapêutico com o *Tnp* que diminuiu a infiltração de linfócitos Th1 ativados e induziu Treg no SNC, não é capaz de diminuir o infiltrado de linfócitos Th17 no cérebro ou no cordão espinhal. IL-1 e IL-6 são essenciais na diferenciação e no crescimento de linfócitos Th17 e a neutralização destas citocinas pode retardar a diferenciação de Th17 *in vivo* em modelo de EAE e ao mesmo tempo promover a diferenciação de linfócitos CD4 com perfil regulatório (SERADA et al., 2008). Este resultado realça a existência de uma correlação entre os subtipos de linfócitos Th17 e Treg (BASU et al., 2013; LEE et al., 2009), confirmando o alto grau de complexidade na determinação de exclusividade na diferenciação dos subtipos de linfócitos Th que muito provavelmente está associado a processos patológicos crônicos e inflamatórios.

O termo T regulador é usado de forma muito ampla para descrever diferentes tipos de células T com função supressora. Entre estas várias classes de células, uma pequena população (5-10%) de linfócitos T CD4^{pos} que expressam constitutivamente a cadeia α do receptor de alta afinidade de IL-2, CD25, têm sido identificadas em murinos e humanos (BAECHER-ALLAN et al., 2001; LEVINGS et al., 2001; SAKAGUCHI et al., 1995). Estas células expressam um fator de transcrição específico, o Foxp3, que tem sido associada ao seu desenvolvimento e função supressora (FONTENOT; RUDENSKY, 2005). Estas células parecem suprimir uma variedade de reações, incluindo respostas de células T e B, assim como respostas crônicas (JONULEIT et al., 2002; SERRA et al., 2003). A maioria das Treg (CD4^{pos} CD25^{pos} Foxp3^{pos}) desenvolvem-se no timo em resposta a autoantígenos, no entanto, células com fenótipo semelhante também podem surgir na periferia (CHEN et al., 2003; JORDAN et al., 2001).

Os mecanismos de ação das Treg naturais ou induzidas não são completamente entendidos, mas envolvem dependente ou não de contato celular a secreção de citocinas inibidoras como IL-10, IL-35 e TGF- β ; citólise dependente de granzimas A e B e perforina; expressão de moléculas imunossupressoras como o CTLA-4; sequestro de citocinas essenciais para o crescimento celular como IL-2; geração de AMP cíclico (potente imunossupressor); inibição da ativação de DC pela interação CTLA-4 e LAG3 com as moléculas CD80/86 e MHC de classe II, respectivamente (DARIO et al., 2008). Por causa das capacidades imunossupressoras das células Treg, estas tornaram candidatos atrativos para imunoterapia. Atualmente, existem numerosos estudos em modelos animais demonstrando seu potencial no controle de doenças autoimunes (MASTELLER et al., 2006).

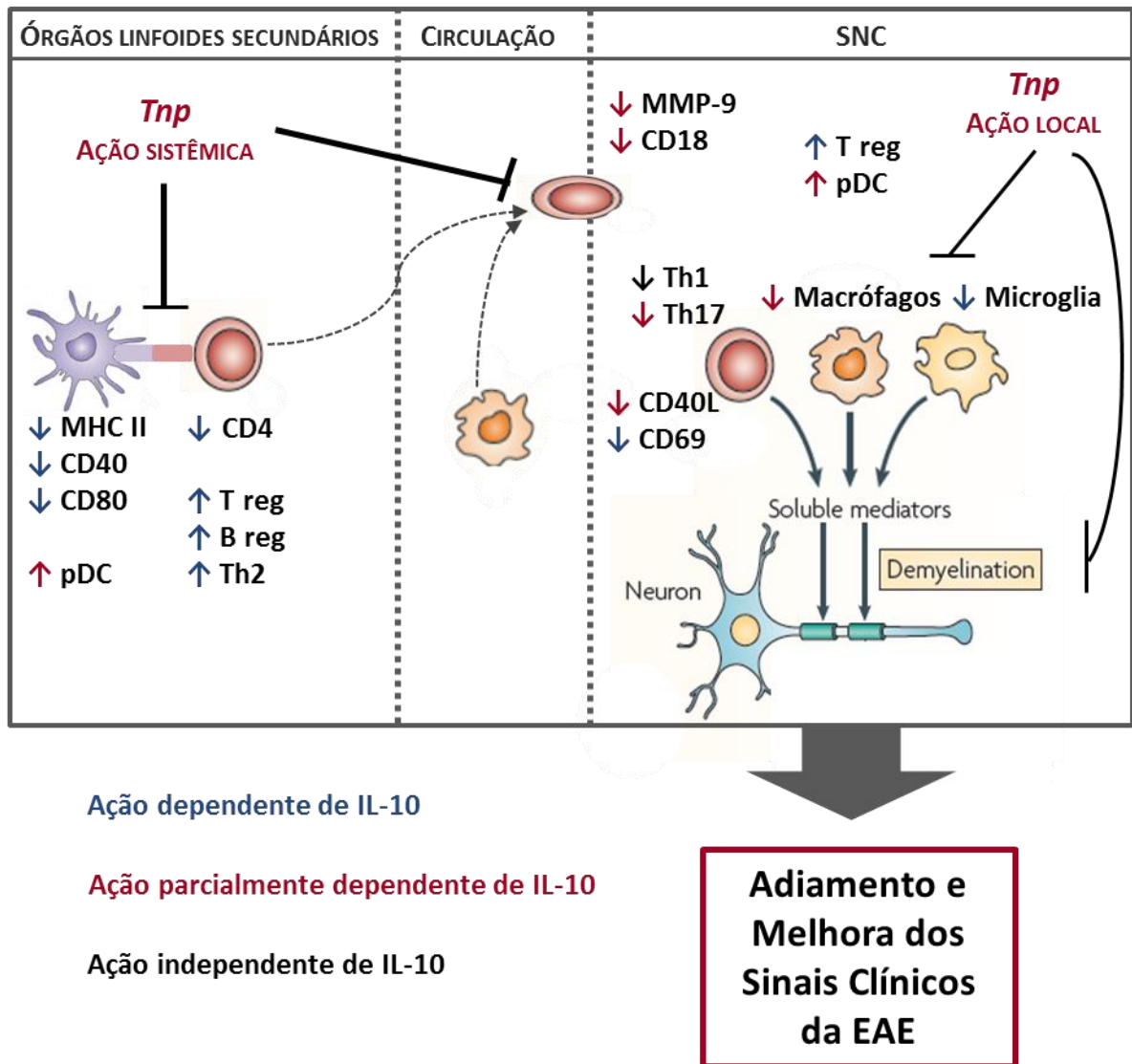
Células B reguladoras (Breg) também desempenham um papel fundamental no controle da autoimunidade (CARTER et al., 2011). Embora os mecanismos de diferenciação das Breg ainda não sejam bem elucidados, a IL-10 contribui para a manutenção desta população celular, uma vez que as Breg expressam os receptores IL-10R1 e IL-10R2. Os mecanismos supressivos das Breg incluem além da secreção de citocinas imunorregulatórias a geração/manutenção de células Treg via ligante GITR (RAY et al., 2012). Relatamos que as Breg só foram geradas durante o tratamento profilático com o *Tnp* de maneira dependente de IL-10 nos tecidos linfoides periféricos, mas não no órgão alvo da EAE, isto é, apenas durante a fase de indução da EAE. Este é um dado bastante interessante, uma vez que há indícios na literatura mostrando que as Breg são importantes para controlar a EAE no início da doença, enquanto durante a progressão da doença o papel das células B está mais relacionado à patogenicidade por ativar os linfócitos T CD4^{pos} e facilitar a entrada destas no SNC (MATSUSHITA et al., 2008, MATSUSHITA et al., 2010).

Finalmente, nossos resultados mostraram que o *Tnp* conseguiu ultrapassar a BHE do SNC e alcançou a região cinzenta do cérebro e do cordão espinhal rica em oligodendrócitos produtores de mielina e provável nicho de degeneração mediada pela neuroinflamação (LEE, 2012; RUDICK; TRAPP, 2009). Nossos dados em conjunto esclarecem os prováveis mecanismos de ação do *Tnp* que pode agir de maneira dependente ou independente da citocina supressora IL-10, pode modular diferentemente diversas moléculas em distintos subtipos celulares de acordo com o regime de aplicação, e pode agir sistêmica ou localmente resultando na atenuação da neuroinflamação e na prevenção da desmielinização. Podemos sugerir com base nos nossos resultados que o *Tnp* agindo de forma sistêmica ou localizada modula diretamente células imunes envolvidas na neuroinflamação como também pode alcançar células não imunes residentes do SNC, gerando efeitos secundários na sobrevivência de oligodendrócitos ou na melhoria de apoio metabólico oligodendroglial de neurônios (BANKSTON et al., 2013).

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, podemos dizer que este estudo permitiu um maior esclarecimento do efeito imunomodulador do *Tnp*, um peptídeo inédito derivado do veneno de *Thalassophryne nattereri* na EAE. O *Tnp* beneficentemente interfere no circuito imunológico em vários estágios por mecanismos parcialmente dependentes de IL-10: 1) suprime o estado de ativação das cDC e propicia a emergência de pDC e de células reguladoras durante a fase de indução da EAE; 2) bloqueia o trânsito e a infiltração de leucócitos para o SNC pela supressão da atividade da MMP-9 e da expressão de CD18; 3) bloqueia a reativação e a permanência de linfócitos Th1 ou Th17 patogênicos no SNC; 4) impede a expansão de células da microglia e o infiltrado de macrófagos no SNC; 5) e ainda favorece o aumento localizado de células T reguladoras. O uso do *Tnp* durante ou entre as crises, ou continuamente gera efeitos sistêmicos ou localizados que resultam na atenuação da neuroinflamação e na prevenção da desmielinização, refletindo assim no adiamento do pico de aparecimento dos sintomas graves e na melhoria dos sinais clínicos da EAE (Fig. 24). Em conclusão podemos dizer que o *Tnp* possui as características importantes para o desenvolvimento de uma droga efetiva no controle da neuroinflamação, como a esclerose múltipla.

Figura 24. Modelo sugerido da ação do *Tnp* no controle da EAE



As células T são inicialmente ativadas nos órgãos linfóides secundários pela apresentação de peptídeos da mielina APC (*esquerda*); as células T e posteriormente os macrófagos alcançam a circulação e ganham acesso ao SNC através da BHE (*meio*). No SNC, as células T são reativadas e medeiam toda uma cascata inflamatória que resultará na desmielinização (*direita*). O *Tnp* beneficemente interfere neste circuito imunológico em vários estágios por mecanismos parcialmente dependentes de IL-10: 1) suprime o estado de ativação das cDC e propicia a emergência de pDC e de células reguladoras durante a fase de indução da EAE; 2) bloqueia o trânsito e a infiltração de leucócitos para o SNC pela supressão da atividade da MMP-9 e da expressão de CD18; 3) bloqueia a reativação e a permanência de linfócitos Th1 ou Th17 patogênicos no SNC; 4) impede a expansão de células da microglia e o infiltrado de macrófagos no SNC; 5) e ainda favorece o aumento localizado de células T reguladoras. O uso do *Tnp* durante ou entre as crises, ou continuamente gera efeitos sistêmicos ou localizados que resultam na atenuação da neuroinflamação e na prevenção da desmielinização, refletindo assim no adiamento do pico de aparecimento dos sintomas graves e na melhoria dos sinais clínicos da EAE.

REFERÊNCIAS*

- ADAM E. H.; ALEXANDER J. W.; GIULIO D.; LAHIRU H.; GAVIN G.; SREERAM V. R. An Updated Meta-Analysis of Risk of Multiple Sclerosis following Infectious Mononucleosis. **PLoS One**, v. 5, n. 9, p. e12496, 2010.
- ADELMAN, B.; SANDROCK, A.; PANZARA, M. A. Natalizumab and progressive multifocal leukoencephalopathy. **N. Engl. J. Med.**, v. 353, p. 432-433, 2005.
- ADORINI, L.; NAGY, Z. A. Peptide competition for antigen presentation. **Immunol. Today**, v. 11, n. 1, p. 21-24, 1990.
- ARCHELOS, J. J.; PREVITALI, S. C.; HARTUNG, H. P. The role of integrins in immunemediated diseases of the nervous system. **Trends Neurosci.**, v. 22, p. 30-38, 1999.
- BAECHER-ALLAN, C.; BROWN, J. A.; FREEMAN, G. J.; HAFLER, D. A. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. **J. Immunol.**, v. 167, p.1245-1253, 2001.
- BANKSTON, A. N.; MANDLER, M. D.; FENG, Y. Oligodendroglia and neurotrophic factors in neurodegeneration. **Neurosci. Bull.** v. 29, n. 2, p. 216-28, 2013.
- BASU, R.; HATTON, R.D.; WEAVER, C.T. The Th17 family: flexibility follows function. **Immunol. Rev.**, v. 252, n. 1, p. 89-103, 2013.
- BAXTER, A. G. The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Nature Rev. Immunol.**, v. 7, p. 904-912, 2007.
- BELKAID, Y.; CHEN, W. Regulatory ripples. **Nat. Immunol.**, v. 11, n. 12, p.1077-1078, 2010.
- BELLOSTA, S.; VIA, D.; CANAVESI, M.; PFISTER, P.; FUMAGALLI, R.; PAOLETTI, R.; BERNINI, F. HMG-CoA reductase inhibitors reduce MMP-9 secretion by macrophages. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 18, p. 1671–1678, 1998.
- BENVENISTE, E. N. Role of macrophages/microglia in multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis. **J. Mol. Med. Review**, v. 75, p. 165-173, 1997.
- BETTELLI, E.; DAS, M. P.; HOWARD, E. D.; WEINER, H. L.; SOBEL, R. A.; KUCHROO, V. K. 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.**, v. 161, n. 7, p. 3299-3306, 1998.
- BIELEKOVA, B.; RICHERT, N.; HOWARD, T.; BLEVINS, G.; MARKOVIC-PLESE, S.; MCCARTIN, J.; FRANK, J. A.; WURFEL, J.; OHAYON, J.; WALDMANN, T. A.; MCFARLAND, H. F.; MARTIN, R. Humanized anti-CD25 (daclizumab) inhibits disease activity in multiple sclerosis patients failing to respond to interferon beta. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 101, p. 8705-8708, 2004.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BULJEVAC, D.; FLACH, H. Z.; HOP, W. C.; HIJDRA, D.; LAMAN, J. D.; SAVELKOUL, H. F.; VAN DER MECHE, F. G.; VAN DOORN, P. A.; HINTZEN, R. Q. Prospective study on the relationship between infections and multiple sclerosis exacerbations. **Brain**, v. 125, p. 952- 960, 2002.

BURT, R. K.; COHEN, B.; ROSE, J.; PETERSEN, F.; OYAMA, Y.; STEFOSKI, D.; KATSAMAKIS, G.; CARRIER, E.; KOZAK, T.; MURARO, P.A.; MARTIN, R.; HINTZEN, R.; SLAVIN, S.; KARUSSIS, D.; HAGGIAG, S.; VOLTARELLI, J.C.; ELLISON, G.W.; JOVANOVIC, B.; POPAT, U.; MCGUIRK, J.; STATKUTE, L.; VERDA, L.; HAAS, J.; ARNOLD, R. Hematopoietic stem cell transplantation for multiple sclerosis. **Arch. Neurol.**, v. 62, p. 860-864, 2005.

CARTER, N. A.; VASCONCELLOS, R.; ROSSER, E. C.; TULONE, C.; MUÑOZ-SUANO, A.; KAMANAKA, M.; EHRENSTEIN, M. R.; FLAVELL, R. A.; MAURI, C. Mice Lacking Endogenous IL-10–Producing Regulatory B Cells Develop Exacerbated Disease and Present with an Increased Frequency of Th1/Th17 but a Decrease in Regulatory T Cells. **J. Immunol.**, v. 186, p. 5525-5526, 2011.

CHEN, M. L.; YAN, B. S.; KOZORIZ, D.; WEINER, H. L. Novel CD8+ Treg suppress EAE by TGF-beta- and IFN-gamma-dependent mechanisms. **Eur. J. Immunol.**, v. 39, n. 12, p. 3423-35, 2009.

CHEN, W.; JIN, W.; HARDEGEN, N.; LEI, K.J.; LI, L.; MARINOS, N.; MCGRADY, G.; WAHL, S. M. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. **J. Exp. Med.**, v. 198, p. 1875-1886, 2003.

COLLISON, L. W.; CHATURVEDI, V.; HENDERSON, A. L.; GIACOMIN, P. R.; GUY, C.; BANKOTI, J.; FINKELSTEIN, D.; FORBES, K.; WORKMAN, C. J.; BROWN, S. A.; REHG, J. E.; JONES, M. L.; NI, H. T.; ARTIS, D.; TURK, M. J.; VIGNALI, D. A. IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nat. Immunol.*, v. 11(12), p. 1093-101, 2010. COLONNA, M.; TRINCHIERI, G.; LIU, Y. J. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. **Nat. Immunol.**, v. 5, p. 1219-1226, 2004.

CORADDU, F.; SAWCER, S.; FEAKES, R.; CHATAWAY, J.; BROADLEY, S.; JONES, H. B.; CLAYTON, D.; GRAY, J.; SMITH, S.; TAYLOR, C.; GOODFELLOW, P. N.; COMPSTON, A. HLA typing in the United Kingdom multiple sclerosis genome screen. **Neurogenetics**, v. 2, n. 1, p. 24-33, 1998.

COX, C. A.; SHIN, G.; YIN, H.; VISTICA, B. P.; WAWROUSEK, E. F.; CHAN, C. C.; GERY, I. Both Th1 and Th17 are immunopathogenic but differ in other key biological activities. **J. Immunol.**, v. 180, p. 7414-7422, 2008.

CRISPIN, J.C.; MARTÍNEZ, A.; DE PABLO, P.; VELASQUILLO, C.; ALCOECER-VARELA, J. Participation of the CD69 antigen in the T-cell activation process of patients with systemic lupus erythematosus. **Scand. J. Immunol.**, v. 48, n. 2, p. 196-200, 1998.

DAI, H.; CIRIC, B.; ZHANG, G. X.; ROSTAMI, A. Interleukin-10 plays a crucial role in suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by Bowman-Birk inhibitor. **J. Neuroimmunol.**, v. 245, n. 1-2, p. 1-7, 2012.

D'ANDREA, A.; ASTE-AMEZAGA, M.; VALIANTE, N. M.; MA, X.; KUBIN, M.; TRINCHIERI, G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. **J. Exp. Med.**, v. 178, n. 3, p. 1041-1048, 1993.

DARIO, A.; VIGNALI, A.; COLLISON, L.W.; WORKMAN, C.J. How regulatory T cells work. **Nature Rev. Immunol.**, v. 8, p. 523-532, 2008.

DE WAAL MALEFYT, R.; ABRAMS, J.; BENNETT, B.; FIGDOR, C. G.; DE VRIES, J. E. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **J. Exp. Med.**, v. 174, n. 5, p. 1209-1220, 1991.

DIA, V.P.; BERHOW, M.A.; GONZALEZ DE MEJIA, E. Bowman-Birk inhibitor and genistein among soy compounds that synergistically inhibit nitric oxide and prostaglandin E2 pathways in lipopolysaccharide-induced macrophages. **J. Agric. Food Chem.**, v. 56, p. 11707-11717, 2008.

DITTEL, B. N. CD4 T cells: Balancing the coming and going of autoimmune-mediated inflammation in the CNS. **Brain Behav. Immun.**, v. 22, p. 421-430, 2008.

EBERS, G. C.; SADOVNICK, A. D.; RISCH, N. J. A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. Canadian Collaborative Study Group. *Nature*. v. 377, n. 6545, p.150-1, 1995.

ELLOSO, M. M.; PHIEL, K.; HENDERSON, R.A.; HARRIS, H. A.; ADELMAN, S. J. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis using estrogen receptor-selective ligands. **J. Endocrinol.**, v. 185, p. 243–252, 2005.

ENG, L. F.; GHIRNIKAR, R. S.; LEE, Y. L. Inflammation in EAE: role of chemokine/cytokine expression by resident and infiltrating cells. **Neurochem. Res.**, v. 21, n. 4, p. 511-525, 1996.

ENGELHARDT, B.; MARTIN-SIMONET, M. T.; ROTT, L. S.; BUTCHER, E. C.; MICHIE, S. A. Adhesion molecule phenotype of T lymphocytes in inflamed CNS. **J. Neuroimmunol.**, v. 84, p. 92-104, 1998.

ENGELHARDT, B.; VAJKOCZY, P.; LASCHINGER, M. Detection of endothelial/lymphocyte interaction in spinal cord microvasculature by intravital videomicroscopy. **Methods Mol. Med.**, v. 89, p. 83-93, 2003.

ERSOY, E.; KUS, C. N. S.; ENERC, U. S.; OKERD, I.; ZORLU, Y. The effects of interferon- β on interleukin-10 in multiple sclerosis patients. **Eur. J. Neurol.**, v. 12, p. 208–211, 2005.

FIORENTINO, D. F.; ZLOTNIK, A.; VIEIRA, P.; MOSMANN, T. R.; HOWARD, M.; MOORE, K. W.; O'GARRA, A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. **J. Immunol.**, v. 146, n. 10, p. 3444-51, 1991.

FONTENOT, J. D.; RUDENSKY, A. Y. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. **Nat. Immunol.**, v. 6, p. 331-337, 2005.

GERMAIN, R. N. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. **Cell**, v. 76, p. 287, 1994.

GREENWOOD, J.; STEINMAN, L.; ZAMVIL, S. S. Statin therapy and autoimmune disease: from protein prenylation to immunomodulation. **Nature rev.**, v. 6, p. 358-370, 2006.

HAFLER, D. A.; SLAVIK, J. M.; ANDERSON, D. E.; O'CONNOR, K. C.; DE JAGER, P.; BAECHER-ALLAN, C. Multiple sclerosis. **Immunol. Rev.**, v. 204, p. 208-31, 2005.

HARRINGTON, L. E.; HATTON, R. D.; MANGAN, P. R.; TURNER, H.; MURPHY, T. L.; MURPHY, K. M.; WEAVER, C. T. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. **Nat. Immunol.**, v. 6, p. 1123-1132, 2005.

HARRISON, L.; HONEYMAN, M. C.; TREMBLEAU, S.; GREGORI, S.; GALLAZZI, F.; AUGSTEIN, P.; BRUSIC, V.; HAMMER, J.; ADORINI, L. A Peptide-binding Motif for I-Ag7, the Class II Major Histocompatibility Complex (MHC) Molecule of NOD and Biozzi AB/H Mice. **J. Exp. Med.**, v. 85, p. 1013–1021, 1997.

HARTUNG, H. P.; GONSETTE, R.; KONIG, N.; KWIECINSKI, H.; GUSEO, A.; MORRISSEY, S. P.; KRAPF, H.; ZWINGERS, T. Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: a placebo-controlled, double-blind, randomised, multicentre trial. **Lancet**, v. 360, p. 2018–2025, 2002.

HEMMER, B.; ARCHELOS, J. J.; HARTUNG, H. P. New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 3, p. 291–301, 2002.

HEMMER, B.; STUVE, O.; KIESEIER, B.; SCHELLEKENS, H.; HARTUNG, H.P. Immune response to immunotherapy: the role of neutralising antibodies to interferon beta in the treatment of multiple sclerosis. **Lancet Neurol.**, v. 4, p. 403–412, 2005.

HOHLFELD, R.; WIENDL, H. The ups and downs of multiple sclerosis therapeutics. **Ann. Neurol.**, v. 49, p.281-284, 2001.

HU, J.; VAN DEN STEEN, P.E.; SANG, Q.X.; OPDENAKKER, G. Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases. **Nature Rev. Drug. Discov.**, v. 6, p. 480–98, 2007.

HUANG, D.; WANG, J.; KIVISAKK, P.; ROLLINS, B.J.; RANSOHOFF, R.M. Absence of Monocyte Chemoattractant Protein 1 in Mice Leads to Decreased Local Macrophage Recruitment and Antigen-specific T Helper Cell Type 1 Immune Response in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **J. Exp. Med.**, v. 193, p. 713–725, 2001.

HUITINGA, I.; DAMOISEAUX, J.G.M.C.; DÖPP, E.A.; DIJKSTRA, C.D. Treatment with anti-CR3 antibodies ED7 and ED8 suppresses experimental allergic encephalomyelitis in lewis rats. **Eur. J. Immunol.**, v. 23, p. 709–715, 1993.

ISAKSSON, M.; ARDESJÖ, B.; RÖNNBLUM, L.; KÄMPE, O.; LASSMANN, H.; ELORANTA, M.L.; LOBELL, A. Plasmacytoid dendritic cells promote priming of autoimmune Th17 cells and experimental autoimmune encephalomyelitis. **Eur. J. Immunol.**, v. 39, n. 10, p. 2925-2935, 2009.

JACOBS, L. D.; COOKFAIR, D. L.; RUDICK, R. A.; HERNDON, R. M.; RICHERT, J. R.; SALAZAR, A. M.; FISCHER, J. S. ; GOODKIN, D. E.; GRANGER, C. V.; SIMON, J. H.; ALAM, J. J.; BARTOSZAK, D. M.; BOURDETTE, D. N.; BRAIMAN, J.; BROWNSCHIEDLE, C. M.; COATS, M. E.; COHAN, S. L.; DOUGHERTY, D. S.; KINKEL, R. P.; MASS, M. K.; MUNSCHAUER, F. E.; 3RD, PRIORE, R. L.; PULLICINO, P. M.; SCHEROKMAN, B. J.; WHITHAM, R. H. Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). **Ann. Neurol.**, v. 39, p. 285-294, 1996.

JOHNSON, K. P.; BROOKS, B. R.; COHEN, J. A.; FORD, C. C.; GOLDSTEIN, J.; LISAK, R. P.; MYERS, L. W.; PANITCH, H. S.; ROSE, J. W.; SCHIFFER, R. B. Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind placebo-controlled trial. The Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. **Neurology**, v. 45, p. 1268-1276, 1995.

JONULEIT, H.; SCHMITT, E.; KAKIRMAN, H.; STASSEN, M.; KNOP, J. ENK, A.H. Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. **J. Exp. Med.**, v. 196, p. 255-260, 2002.

JORDAN, M. S.; BOESTEANU, A.; REED, A. J.; PETRONE, A. L.; HOLENBECK, A. E.; LERMAN, M. A.; NAJI, A.; CATON, A. J. Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. **Nat. Immunol.**, v. 2, p. 301-306, 2001.

KALMAN, K.; PENNINGTON, M.W.; LANIGAN, M.D.; NGUYEN, A.; RAUER, H.; MAHNIR, V.; PASCHETTO, K.; KEM, W.R.; GRISSMER, S.; GUTMAN, G.A.; CHRISTIAN, E.P.; CAHALAN, M.D.; NORTON, R.S.; CHANDY, K.G. ShK-Dap22, a potent Kv1.3-specific immunosuppressive polypeptide. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 32697–32707, 1998.

KASPER, L. H.; HAQUE, A.; HAQUE, S. Regulatory mechanisms of the immune system in multiple sclerosis. T regulatory cells: turned on to turn off. **J. Neurol.**, v.254, p. 10-14, 2007.

KENNEDY A. R. Chemopreventive agents: protease inhibitors. **Pharmacol. Ther.**, v. 78, p. 167–209, 1998.

KENNEDY A. R. The status of human trials utilizing Bowman Birk Inhibitor Concentrate from soybeans. In Sugano M ed. Soy in health and disease prevention . **CRC Press LLC**, 2005.

KENNEDY, M. K.; TORRANCE, D. S.; PICHA, K. S.; MOHLER, K. M. Analysis of cytokine mRNA expression in the central nervous system of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis reveals that IL-10 mRNA expression correlates with recovery. **J. Immunol.**, v. 149, n. 7, p. 2496-505, 1992.

KUCHROO, V.K.; ANDERSON, A.C.; WALDNER, H.; MUNDER, M.; BETTELLI, E.; NICHOLSON, L.B. T cell response in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): role of self and cross-reactive antigens in shaping, tuning, and regulating the autopathogenic T cell repertoire. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 20, p. 101–123, 2002.

KWAK, B.; MULHAUPT, F.; MYIT, S.; MACH, F. Statins as a newly recognised type of immunomodulator. **Nature Med.**, v. 6, p. 1399–1402, 2000.

LAMONT, A. G.; POWELL, M. F.; COLÓN, S. M.; MILES, C.; GREY, H. M.; SETTE, A. The use of peptide analogs with improved stability and MHC binding capacity to inhibit antigen presentation *in vitro* and *in vivo*. **J. Immunol.**, v. 144, n. 7, p. 2493-8, 1990.

LARIONOVA, N. I.; GLADYSHEVA, I. P.; TIKHONOVA, T. V.; KAZANSKAIA, N. F. Inhibition of cathepsin G and elastase from human granulocytes by multiple forms of the Bowman-Birk type of soy inhibitor. **Biokhimiia**. v. 58, n. 9, p. 1437-44, 1993.

LEE, Y.; MORRISON, B.M.; LI, Y.; LENGACHER, S.; FARAH, M.H.; HOFFMAN, P.N.; LIU, Y.; TSINGALIA, A.; JIN, L.; ZHANG, P.W.; PELLERIN, L.; MAGISTRETTI, P.J.; ROTHSTEIN, J.D. Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. **Nature** v. 487, p. 443–448, 2012.

LEE, Y.K.; MUKASA, R.; HATTON, R.D.; WEAVER, C.T. Developmental plasticity of Th17 and Treg cells. **Curr Opin Immunol.**, v. 21, n. 3, p. 274-80, 2009.

LEVINGS, M.K.; SANGREGORIO, R.; RONCAROLO, M.G. Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded *in vitro* without loss of function. **J. Exp. Med.**, v. 193, p. 1295-1302, 2001.

LEWIS, R.J.; GARCIA, M.L. Therapeutic potential of venom peptides. **Nature rev.**, v.2, p. 790-802, 2003.

LUBLIN, F.D.; REINGOLD, S.C. "Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey," **Neurol.**, v. 46, n. 4, p. 907–911, 1996.

LUND, F.E.; RANDALL, T.D. Effector and regulatory B cells: modulators of CD4⁺ T cell immunity. **Nature Rev. Immunol.**, v. 10, p. 236-247, 2010.

MAHNKE, K.; QIAN, Y.; KNOP, J.; ENK, A. H. Induction of CD4⁺/CD25⁺ regulatory T cells by targeting of antigens to immature dendritic cells. **Blood.**, v. 101, n. 12, p. 4862-9, 2003.

MANN, M. K.; MARESZ, K.; SHRIVER, L. P.; TAN, Y.; DITTEL, B. N. B cell regulation of CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells and IL-10 via B7 is essential for recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. **J. Immunol.**, v. 178, p. 3447–3456, 2007.

MASTELLER, E.L.; TANG, Q.; BLUESTONE, J.A. Antigen-specific regulatory T cells -- ex vivo expansion and therapeutic potential. **Semin. Immunol.**, v. 18, p. 103-110, 2006.

MATHISEN, P. M.; YU, M.; JOHNSON, J. M.; DRAZBA, J. A.; TUOHY, V. K. Treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis with genetically modified memory T cells. **J. Exp. Med.**, v. 186, n. 1, p. 159-64, 1997.

MATSUSHITA, T.; HORIKAWA, M.; IWATA, Y.; TEDDER, T. F. Regulatory B cells (B10 Cells) and regulatory t cells have independent roles in controlling experimental autoimmune encephalomyelitis initiation and late-phase immunopathogenesis. **J. Immunol.**, v. 185, p. 2240-2252, 2010.

MATSUSHITA, T.; YANABA, K.; BOUAZIZ, J.D.; FUJIMOTO, M.; TEDDER, T. F. Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. **J. Clin. Invest.**, v. 118, p. 3420–3430, 2008.

MCELROY, J. P.; OKSENBERG, J. R. Multiple sclerosis genetics. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 318, p. 45–72, 2008.

MCGEACHY, M.J.; STEPHENS, L.A.; ANDERTON, S.M. Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4⁺CD25⁺ regulatory cells within the central nervous system. **J. Immunol.**, v. 175, n. 5, p. 3025-32, 2005.

MENDEL, I.; KERLERO DE ROSBO ,N.; BEN-NUN, A. A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V β expression of encephalitogenic T cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 25, p. 1951–1959, 1995.

METZ, L. M.; ZHANG Y.; YEUNG, M.; PATRY, D. G.; BELL, R. B.; STOIAN, C. A.; YONG, V. W.; PATTEN, S. B.; DUQUETTE, P.; ANTEL, J. P.; MITCHELL, J. R. Minocycline reduces gadolinium-enhancing magnetic resonance imaging lesions in multiple sclerosis. **Ann. Neurol.**, v. 55, p. 756, 2004.

MILLER, E. Multiple sclerosis. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v.724, p. 222-38, 2012.

MILSTONE, A. M.; HARRISON, L. M.; BUNGIRO, R. D.; KUZMIC, P.; CAPPELLO, M. A broad spectrum Kunitz type serine protease inhibitor secreted by the hookworm *Ancylostoma ceylanicum*. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 38, p. 29391-9, 2000.

MIYAMOTO, K.; MIYAKE, S.; MIZUNO, M.; OKA, N.; KUSUNOKI, S.; YAMAMURA, T. Selective COX-2 inhibitor celecoxib prevents experimental autoimmune encephalomyelitis through COX-2-independent pathway. **Brain**, v. 129, p. 1984–1992, 2006.

MOORE, K. W.; O'GARRA, A.; DE WAAL MALEFYT, R.; VIEIRA, P.; MOSMANN, T. R. Interleukin-10. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 11, p. 165-90, 1993.

MOSER, M.; DE SMEDT, T.; SORNASSE, T.; TIELEMANS, F.; CHENTOUFI, A. A.; MURAILLE, E.; VAN MECHELEN, M.; URBAIN, J.; LEO, O. Glucocorticoids down-regulate dendritic cell function *in vitro* and *in vivo*. **Eur. J. Immunol.**, v. 25, n. 10, p. 2818-24, 1995.

NEUHAUS, O.; FARINA, C.; WEKERLE, H.; HOHLFELD, R. Mechanisms of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis. **Neurology**, v. 56, p. 702-708, 2001.

ODANI, S.; IKENAKA, T. Studies on soybean trypsin inhibitors. 8. Disulfide bridges in soybean Bowman-Birk proteinase inhibitor. **J. Biochem.**, v. 74, n. 4, p. 697-715, 1973.

OLERUP, O.; HILLERT, J. HLA class II-associated genetic susceptibility in multiple sclerosis: a critical evaluation. **Tissue Antigens**, v. 38, p. 1-15, 1991.

ONESTI, S.; BRICK, P.; BLOW, D. M. Crystal structure of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Erythrina caffra* seeds. **J. Mol. Biol.**, v. 217, n. 1, p. 153-76, 1991.

PAGE-MCCAW, A.; EWALD, A.J.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 8, p. 221-233, 2007.

PALMER, A. M. Multiple sclerosis and the blood-central nervous system barrier. **Cardiovasc. Psychiatry Neurol.**, v. p. 1 -10, 2013.

PARK, J. H.; JEONG, H. J.; LUMEN, B. O. *In vitro* digestibility of the cancer-preventive soy peptides lunasin and BBI. **J. Agric. Food Chem.**, v.55, n. 26, p. 10703-6, 2007.

PASCHALIDIS, N.; IQBAL, A. J.; MAIONE, F.; WOOD, E. G.; PERRETTI, M.; FLOWER, R. J.; D'ACQUISTO, F. Modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by endogenous annexin A1. **J. Neuroinflammation.**, v. 6, p. 33, 2009.

PEÑA-CRUZ, V.; MCDONOUGH, S. M.; DIAZ-GRIFFERO, F.; CRUM, C. P.; CARRASCO, R. D.; FREEMAN, G. J. PD-1 on immature and PD-1 ligands on migratory human Langerhans cells regulate antigen-presenting cell activity. **J. Invest. Dermatol.**, v. 130, n. 9, p. 2222-30, 2010.

PENNA, G., ADORINI, L. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. **J. Immunol.**, v. 167, p. 2405-2411, 2000.

POLMAN, C.H.; REINGOLD, S.C.; EDAN, G., FILIPPI, M.; HARTUNG, H.P.; KAPPOS, L.; LUBLIN, F.D.; METZ, L.M.; MCFARLAND, H.F.; O'CONNOR, P.W.; SANDBERG-WOLLHEIM, M.; THOMPSON, A.J.; WEINSHENKER, B.G.; WOLINSKY, J.S. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald criteria". **Ann Neurol.**, v. 58, p. 840-846, 2005.

PUENTE X.S.; SANCHEZ L.M.; OVERALL C.M.; LOPEZ-OTIN, C. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. **Nature Reviews Genetics**, v 4, p. 544–558, 2003.

QI, R.F.; SONG, Z.W.; CHI, C.W. Structural features and molecular evolution of Bowman–Birk protease inhibitors and their potential application (Shanghai.) **Acta Biochim. Biophys. Sin.**, v. 37, p. 283–292, 2005.

RACKE, M. K.; BONOMO, A.; SCOTT, D. E.; CANNELLA, B.; LEVINE, A.; RAINE, C. S.; SHEVACH, E. M.; RÖCKEN, M. Cytokine-induced immune deviation as a therapy for inflammatory autoimmune disease. **J. Exp. Med.**, v. 180, n. 5, p. 1961-1966, 1994.

RAY, A.; BASU, S.; WILLIAMS, C. B.; SALZMAN, N. H.; DITTEL, B. N. A novel IL-10-independent regulatory role for B cells in suppressing autoimmunity by maintenance of regulatory T cells via GITR ligand. **J. Immunol.**, v. 188, n. 7, p. 3188-3198, 2012.

REMLINGER, P. Les paralysies du traitement antirabique. **Ann. Institut. Pasteur**, v. 55, p. 35–68, 1928.

RIVERS, T. M.; SPRUNT, D. H.; GERRY, B. P. Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. **J. Exp. Med.**, v. 58, p. 39–53, 1933.

ROMANO, M.; DIOMEDE, L.; SIRONI, M.; MASSIMILIANO, L.; SOTTOCORNO, M.; POLENTARUTTI, N.; GUGLIELMOTTI, A.; ALBANI, D.; BRUNO, A.; FRUSCELLA, P.; SALMONA, M.; VECCHI, A.; PINZA, M.; MANTOVANI, A. Inhibition of monocyte chemotactic protein-1 synthesis by statins. **Lab. Invest.**, v. 80, p. 1095–1100, 2000.

ROVARIS M.; CONFAVREUX C.; FURLAN R.; KAPPOS COMI, L. G.; FILIPPI, M. “Secondary progressive multiple sclerosis: current knowledge and future challenges. **Lancet Neurology**, v. 5, n. 4, p. 343–354, 2006.

RUDICK, R. A.; TRAPP, B. D. Gray-matter injury in multiple sclerosis. **N. Engl. J. Med.** v. 361, p. 1505–1506, 2009.

RUNIA, T. F.; VAN PELT-GRAVESTEIJN, E. D.; HINTZEN, R. Q. Recent Gains in Clinical Multiple Sclerosis Research Review. **CNS Neurol. Disord. Drug Targets**, 2012.

SADOVNICK, A. D.; EBERS, G. C.; DYMENT, D. A.; RISCH, N. J. Evidence for genetic basis of multiple sclerosis. The Canadian Collaborative Study Group. **Lancet**, v. 347, n. 9017, p. 1728-1730, 1996.

SAKAGUCHI, S.; SAKAGUCHI, N.; ASANO, M.; ITOH, M.; TODA, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. **J. Immunol.**, v.155, p. 1151-1164, 1995.

SAKAGUCHI, S.; ONO, M.; SETOGUCHI, R. YAGI, H.; HORI, S.; FEHERVARI, Z.; SHIMIZU, J.; TAKAHASHI, T.; NOMURA, T. FoxP3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant selftolerance and autoimmune disease. **Immunol. Rev.**, v. 212, p. 8–27, 2006.

SAMOILOVA, E. B.; HORTON, J. L.; CHEN, Y. Acceleration of experimental autoimmune encephalomyelitis in interleukin-10-deficient mice: roles of interleukin-10 in disease progression and recovery. **Cell Immunol.**, v. 188, n. 2, p. 118-124, 1998.

SERADA, S.; FUJIMOTO, M.; MIHARA, M.; KOIKE, N.; OHSUGI, Y.; NOMURA, S.; YOSHIDA, H.; NISHIKAWA, T.; TERABE, F.; OHKAWARA, T.; TAKAHASHI, T.; RIPLEY, B.; KIMURA, A.; KISHIMOTO, T.; NAKA, T. IL-6 blockade inhibits the induction of myelin antigen-specific Th17 cells and Th1 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 105, p. 9041-9046, 2008.

SERRA, P.; AMRANI, A.; YAMANOUCHI, J.; HAN, B.; THIESSEN, S.; UTSUGI, T.; VERDAGUER, J.; SANTAMARIA, P. CD40 ligation releases immature dendritic cells from the control of regulatory CD4+CD25+ T cells. **Immunity**, v. 19, p. 877-889, 2003.

SHIGETOMI, H.; ONOGI, A.; KAJIWARA, H.; YOSHIDA, S.; FURUKAWA, N.; HARUTA, S.; TANASE, Y.; KANAYAMA, S.; NOGUCHI, T.; YAMADA, Y.; OI, H.; KOBAYASHI, H. Anti-inflammatory actions of serine protease inhibitors containing the Kunitz domain. **Inflamm. Res.**, v. 59, n. 9, p. 679-687, 2010.

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

STEINMAN, L.; ROSENBAUM, J. T.; SRIRAM, S.; MCDEVITT, H. O. *In vivo* effects of antibodies to immune response gene products: prevention of experimental allergic encephalitis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 78, n. 11, p. 7111-7114, 1981.

STEINMAN, R. M.; HAWIGER, D.; NUSSENZWEIG, M. C. Tolerogenic dendritic cells. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 21, p. 685-711, 2003.

STUVE, O.; CEPOK, S.; ELIAS, B.; SALEH, A.; HARTUNG, H.P.; HEMMER, B.; KIESEIER, B.C. Clinical stabilization and effective B-lymphocyte depletion in the cerebrospinal fluid and peripheral blood of a patient with fulminant relapsing-remitting multiple sclerosis. **Arch Neurol.**, v. 62, p.1620-1623, 2005.

STUVE, O.; CREE, B. C.; VON BUDINGEN, H. C.; YOUSEF, S.; BOWEN, J. D.; GENAIN, C. P.; HAUSER, S. L.; STEINMAN, L.; ZAMVIL, S. S. Approved and future pharmacotherapy for multiple sclerosis. **Neurologist**, v. 8, p.290-301, 2002.

SUAREZ-KURTZ, G.; VIANNA-JORGE, R.; PEREIRA, B. F.; GARCIA, M. L.; KACZOROWSKI, G. J. Peptidyl inhibitors of shaker-type Kv1 channels elicit twitches in guinea pig ileum by blocking kv1.1 at enteric nervous system and enhancing acetylcholine release. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 289, n. 3, p.1517-22, 1999.

THEIL, M.M.; MIYAKE, S.; MIZUNO, M.; TOMI,C.; CROXFORD, J.L.; HOSODA, H.; THEIL, J.; VON HORSTEN, S.; YOKOTE, H.; CHIBA, A.; LIN, Y.; OKI, S.; AKAMIZU, T.; KANGAWA, K.; YAMAMURA, T. Suppression of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Ghrelin1. **J. Immunol.**, v. 183, p. 2859-2866, 2009.

VAN OOSTEN, B.W.; LAI, M.; BARKHOF, F.; MILLER, D.H.; MOSELEY, I.F.; THOMPSON, A.J.; HODGKINSON, S.; POLMAN, C.H. A phase II trial of anti-CD4 antibodies in the treatment of multiple sclerosis. **Mult. Scler.**, v. 1, p. 339-342, 1996.

VANDENBARK, A. A.; FINN, T.; BARNES, D.; CULBERTSON, N.; CHOU, Y. K.; HICKS, K.; BAKKE, A.; MASS, M.; WHITHAM, R.; OFFNER, H.; BOURDETTE, D. Diminished frequency of interleukin-10-secreting, T-cell receptor peptide-reactive T cells in multiple sclerosis patients might allow expansion of activated memory T cells bearing the cognate BV gene. **J. Neurosci. Res.**, v. 66, n. 2, p. 171-6, 2001.

VOLLMER, T.; KEY, L.; DURKALSKI, V.; TYOR, W.; CORBOY, J.; MARKOVIC-PLESE, S.; PREININGEROVA, J.; RIZZO, M.; SINGH, I. Oral simvastatin treatment in relapsingremitting multiple sclerosis. **Lancet**, v. 363, p. 1607-1608, 2004.

WADA, Y.; HISAMATSU, T.; KAMADA, N.; OKAMOTO, S.; HIBI, T. Retinoic acid contributes to the induction of IL-12-hypoproducing dendritic cells. **Inflamm. Bowel. Dis.**, v. 15, n. 10, p. 1548-1556, 2009.

WARE, J. H.; WAN, X. S.; RUBIN, H.; SCHECHTER, N. M.; KENNEDY, A. R. Soybean Bowman-Birk protease inhibitor is a highly effective inhibitor of human mast cell chymase. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 344, n. 1, p. 133-138, 1997.

WEITZ-SCHMIDT, G.; WELZENBACH, K.; BRINKMANN, V.; KAMATA, T.; KALLEN, J.; BRUNS, C.; COTTENS, S.; TAKADA, Y.; HOMMEL, U. Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site. **Nature Med.**, v. 7, p. 687-692, 2001.

WORD HEALTHY ORGANIZATION. **Atlas Multiple Sclerosis**. 2008. Disponível em: http://www.who.int/mental_health/neurology/Atlas_MS_WEB.pdf. Acesso em: 25 out. 2012.

WRAITH, D. C.; SMILEK, D. E.; MITCHELL, D. J.; STEINMAN, L.; MCDEVITT, H. O. Antigen recognition in autoimmune encephalomyelitis and the potential for peptide-mediated immunotherapy. **Cell.**, v. 59, n. 2, p. 247-55, 1989.

YANG, J.; JIANG, Z.; FITZGERALD, D.C.; MA, C.; YU, S.; LI, H.; ZHAO, Z.; LI, Y.; CIRIC, B.; CURTIS, M.; ROSTAMI, A.; ZHANG, G.X. Adult neural stem cells expressing IL-10 confer potent immunomodulation and remyelination in experimental autoimmune encephalitis. **J. Clin. Invest.**, v. 119, n. 12, p. 3678-91. 2009.

YONG, V. W. Differential mechanisms of action of interferon-beta and glatiramer acetate in MS. **Neurology**, v. 59, p. 802-808, 2002.

YONG, V.W. Metalloproteinases: mediators of pathology and regeneration in the CNS. *Nature Rev. Neurosci.*, v. 6, p. 931-944, 2005.

YOUSSEF, S.; STÜVE, O.; PATARROYO, J. C.; RUIZ, P. J.; RADOSEVICH, J. L.; HUR, E. M.; BRAVO, M.; MITCHELL, D. J.; SOBEL, R. A.; STEINMAN, L.; ZAMVIL, S. S. The HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, promotes a Th2 bias and reverses paralysis in central nervous system autoimmune disease. **Nature**, v. 420, p. 78-84, 2002.

YU, C. R.; LEE, Y. S.; MAHDI, R. M.; SURENDRAN, N.; EGWUAGU, C. E. Therapeutic targeting of STAT3 (signal transducers and activators of transcription 3) pathway inhibits experimental autoimmune uveitis. **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. 29742, 2012.

ZHANG, B.; YAMAMURA, T.; KONDO, T.; FUJIWARA, M.; TABIRA, T. Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by natural killer (NK) cells. **J. Exp. Med.**, v. 186, p. 1677-1687, 1997.

ZHANG, J.; WEINER, H. L.; HAFLER, D. A. Autoreactive T cells in multiple sclerosis. **Int. Rev. Immunol.**, v. 9, n. 3, p. 183-201, 1992.

ZOZULYA, A. L.; WIENDL, H. The role of regulatory T cells in multiple sclerosis. **Nature Clinical Practice Neurology**, v. 4, n. 8, p. 384-398, 2008.