Luciana Paroneto Medina

Estudo da relação entre a modulação da expressão de FASL pela PGE_2 e a sobrevivência de linfócitos T $CD4^+$

Tese apresentada ao Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2015

Luciana Paroneto Medina

Estudo da relação entre a modulação da expressão de FASL pela PGE_2 e a sobrevivência de linfócitos T $CD4^+$

Tese apresentada ao Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. João Gustavo Pessini Amarante-Mendes

Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Salgado Basso (UNIFESP)

Versão original

São Paulo
2015

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

Medina, Luciana Paroneto.
Estudo da relação entre a modulação da expressão de FASL pela PGE2 e a sobrevivência de linfócitos TCD+ / Luciana Paroneto Medina. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Dr. João Gustavo Pessini Amarante Mendes.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Controle molecular do processo de AICD.

Versão do título para o inglês: Modulation of FASL expression by PGE2 and CD4+ T lymphocyte survival.

1. Encefalomielite autoimune experimental 2. Linfócitos T CD4+ 3. FASL 4. Prostaglandina E2 I. Mendes, Prof. Dr. João Gustavo Pessini Amarante II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB0161/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Luciana Paroneto Medina.

Título da Tese: Estudo da relação entre a modulação da expressão de FASL pela PGE2 e a sobrevivência de linfócitos TCD+.

Orientador(a): Prof. Dr. João Gustavo Pessini Amarante Mendes.

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 **206** nas fls. **117** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **João Gustavo Pessini Amarante-Mendes**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa *"Estudo da relação entre a modulação da expressão de FASL pela PGE2 e a sobrevivência de LTCD4+"* do qual participam o(s) aluno(s) **Luciana Paroneto Medina,** 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 **18.04.2012, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 18 de abril de 2012.

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

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

Aos meus pais, Hilton Medina e Nair Medina, que possibilitaram a realização de mais este sonho.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao meu orientador, Prof Gustavo Amarante-Mendes, pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa na iniciação científica, no mestrado e agora no doutorado. Agradeço por todos os ensinamentos durante todos esses anos.

Agradeço aos meus muito mais que colegas de laboratório, aos meus amigos do lab 244: Bárbara Mello, Bárbara Saty, Carolina Quina, Cristiane Naffah, Daniel Chiminazzo, Emília Santiago, Flávia Matos, Giulia Ramella, Henry Montero, Inaê Nascimento, Jacqueline Jacysyn, Jennifer Marx, Julia Campopiano, Marcela Torres, Melanie Gonzales, Narciso Vieira, Nathalia Cruz, Paola Vendramini, Priscila Cabral, Priscilla Denapoli, Rodolfo Correia, Sandy Adjemian Talita Tawane e Tiago Machado, pela convivência e por todos as experiências e momentos compartilhados.

Agradeço ao meu coorientador, Prof. Alexandre Basso, por ter aceitado fazer parte deste projeto e por ter aberto as portas de seu laboratório para mim! Obrigada por ceder o espaço e os reagentes, obrigada pelas discussões e sugestões. Agradeço também a todos de seu laboratório que sempre me receberam muito bem e me fizeram sentir em “casa”: Carla Aquino, Filipe de Melo, Juliana Maricato, Márcia Guereschi, Maysa Takenata, Vanessa Nascimento e principalmente ao Leandro Araujo, meu colaborador, que tanto me ensinou e me ajudou na maior parte dos experimentos. Obrigada também pelo incentivo nos momentos mais complicados!

Agradeço a Professora Daniela Santoro e a sua aluna Juliana Apostólico pela ajuda com a técnica de ELISPOT.

Agradeço ao Prof. João Viola e a sua aluna Cristiane Secca por terem nos recebido tão bem no INCA para realização dos experimentos de diferenciação de subpopulações de linfócitos $TCD4^{+}$.

Agradeço a todos os colegas e funcionários do departamento: a Eni, João, Jotelma, Amanda, funcionários da limpeza, do áudio visual (Márcio e Moyses), ao pessoal do biotério (Ana, Márcio, Regina, Silvia) a todos os porteiros e zeladores: Otacílio, Milton, Delman, Juscelino, Aírton, Geraldo, Nilson. Todos sempre muito prestativos!

Agradeço a Monica da Biblioteca por ter sido tão prestativa e pela imensa ajuda com a formatação da tese.

Agradeço a todos os professores com quem fiz monitoria PAE durante o doutorado, Sonia Negro, Ronni Brito, Eva Burger e Magnus Gidlund, por todos os ensinamentos adquiridos e compartilhados na monitoria.

Agradeço aos membros da minha banca de qualificação, Jean Peron, Carolina Munhoz e Alessandro Farias, pela valiosa discussão e pelas críticas e sugestões que fizeram e que me permitiram progredir muito neste projeto.

Agradeço aos professores que aceitaram fazer parte da minha banca de defesa do doutorado, Jean Peron, Alexandre Steiner, Maristela Camargo, Niels Camara, Frederico da Costa Pinto, Luiz Andrade, Verônica Coelho e Jefferson Russo.

Agradeço as agências de fomento que financiaram este projeto e sem as quais esta pesquisa não seria possível: FAPESP, CNPq e INCT.

Por fim e claro, não menos importante, agradeço a toda a minha família e amigos que de alguma forma contribuíram para o andamento deste projeto, principalmente, aos meus pais, Hilton e Nair, que sempre me apoiaram, me incentivaram e me ajudaram em todas as etapas e ao Osmar pela compreensão e paciência durante todo este tempo. Obrigada por tudo!!!

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus não sou o que era antes.”

Martin Luther King

RESUMO

Medina LP. Estudo da relação entre a modulação da expressão de FASL pela PGE_2 e a sobrevivência de linfócitos $TCD4^+$. [tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

Os linfócitos T CD4 são células da imunidade adaptativa que desempenham um papel fundamental na resposta imunológica. Em uma resposta imune, é importante que ocorra um balanço entre proliferação e morte celular para retornar ao estado de homeostasia. Esta pode ser controlada por dois mecanismos: morte autônoma de células T ativadas (ACAD) e morte celular induzida por ativação (AICD). Resultados previamente obtidos pelo nosso grupo demonstraram, *in vitro*, que a prostaglandina E_2 (PGE_2) é capaz de modular a sobrevivência de linfócitos $TCD4^+$ protegendo essas células do processo AICD. Para estudar essa modulação *in vivo* optamos por um modelo murino de autoimunidade, a Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE). Dentro desse contexto, nossa hipótese é que a PGE_2 liberada pelas APCs, durante a fase de indução da EAE, modula a sobrevivência de linfócitos autorreativos específicos, favorecendo o desenvolvimento da doença. Para testar essa hipótese, realizamos o tratamento de camundongos submetidos à EAE com indometacina, um inibidor não-seletivo de COX-1 e COX-2, durante os 5 primeiros dias, e notamos que a indometacina foi capaz de reduzir a progressão da doença. É importante destacar que este fenômeno não é observado se o tratamento com indometacina é realizado após início dos sinais clínicos. Através de análise histológica e imunofenotipagem por citometria de fluxo, demonstramos que há menos linfócitos produtores de IFN-γ, IL-17 e GM-CSF, e menos macrófagos e microglias ativadas no sistema nervoso central do grupo experimental. Finalmente, o tratamento com indometacina alterou a freqüência de células em proliferação, *ex vivo*, e a freqüência de células produtoras de IL-17 nos linfonodos drenantes, bem como a concentração dessas citocinas no sobrenadante dessas células. Esses resultados sugerem que a indometacina reduz o desenvolvimento da EAE e sua resposta antígeno-específica demonstrando a sua importância na modulação das respostas de linfócitos T na autoimunidade.

Palavras-chave: Encefalomielite autoimune experimental. Linfócitos $TCD4^+$. FASL. Prostaglandina E_2.

ABSTRACT

Medina LP. Modulation of FASL expression by PGE_2 and $CD4^+$ T lymphocyte survival. [Ph. D. thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

CD4 T lymphocytes are adaptive immunity cells that play an essential role in the immune response. In an immune response, it is important that exist balance between cell proliferation and death to return homeostasis state. This can be controlled by: activated T cell autonomous death (ACAD) and activation induced cell death (AICD). Results published by our group demonstrated, in vitro, that PGE_2 is able to modulate $CD4^+$ T lymphocyte survival protecting these cells from AICD process. To study this modulation in vivo we choose a murine model of autoimmunity, Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE). In this context, our hypothesis is that PGE_2 secreted by APCs, during the induction phase of EAE, modulates lymphocyte autoreactive specific survival, favoring the disease development. To test this hypothesis, we performed the treatment of mice undergoing EAE with indomethacin, a non-selective COX-1 and COX-2 inhibitor, during the first 5 days from the immunization day, and we observe that indomethacin was able to reduces disease progression. It is important to note that this phenomenon is not observed if treatment with indomethacin is performed after onset of clinical signs. Through histological analysis and immunophenotyping by flow cytometry, we demonstrate that there is less IFN-γ^+, IL-17^+ and GM-CSF^+ producing T cells and less macrophages and activated microglia in the central nervous system (CNS) in the the experimental group. Finally, treatment with indomethacin altered the frequency of proliferating cells, ex vivo, and the frequency of IL-17^+ producing T cells in the draining lymph nodes as well as concentration of these cytokines in these cells supernatant. These results suggest that indomethacin reduces the development of EAE and antigen-specific immune response demonstrating its role in the modulation of T lymphocyte responses in autoimmunity.

Keywords: Experimental autoimmune encephalomyelitis. $CD4^+$ T lymphocytes. FASL. Prostaglandin E_2.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%: porcentagem

< menor

> maior

ºC: grau Celsius

«**L:** microlitros

«**m:** micrômetros

ACAD: *activated T cell autonomous death* – morte autônoma de células T ativadas

AICD: *activation induced cell death* – morte celular induzida por ativação

APAF-1: *apoptotic protease-activating factor 1*

APC: *antigen presenting cells* – células apresentadoras de antígenos

ATP: *adenosine triphosphate* – trifosfato de adenosina

BAK: *BCL-2 antagonist killer 1*

BAX: *BCL-2-associated X protein*

BCL-2: *B-cell CLL/Lymphoma 2* –

BID: *BH3-interacting domain death agonist*

BIM: *Bcl-2 interacting mediator*

cAMP: *cyclic adenosine monophosphate* – monofosfato de adenosina cíclica

CASPASES: *cysteine-aspartic proteases*

CD: *cluster* de diferenciação

CFA: *complete Freund`s adjuvant* – adjuvante completo de Freund

c-FLIP: *cellular FLICE-like inhibitory protein* – proteína celular inibidora semelhante a FLICE

CNS: *central nervous system* – sistema nervoso central

COX: *cyclooxygenase* – ciclo-oxigenase

CREB: *cAMP responsive element binding factor*

CWID: *cytokine withdrawal-induced death* – morte induzida pela retirada de citocinas

d: dias

DED: *death efector domain* – domínio efetor de morte

DD: *death domain* - domínio de morte

ddH_20: *double destilled* – água milliQ

DISC: *death-inducing signaling complex* – complexo de sinalização indutor de morte

DRs: *death receptors* – receptores de morte

EAE: *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis* – Encefalomielite Autoimune Experimental

EDTA: *ethylenediamine tetra acetic acid* - ácido dietilenodiaminotetracético

EP: *E prostanoid*

EPAC: *exchange protein directly activated by cAMP*

FADD: *fas-associated death domain* – domínio de morte associado a FAS

FCS: *fetal calf serum* – soro fetal de bezerro

g: gramas

g: força de centrifugação relativa

h: hora

H&E: *hematoxylin and eosin* - hematoxilina e eosina

IFA: *Incomplete Freund´s Adjuvant* – Adjuvante incompleto de Freund

kg: kilogramas

KO: *knockout*

i.p.: *intraperitoneal* - intraperitoneal

LPS: *Lipopolysaccharide* - lipopolissacarídeo

LTCD4$^+$: linfócitos TCD4 ativados

L: litros

mL: mililitros

mg: miligramas

mM: milimolar

min: minutos

MMP9: *matrix metalloproteinase* – metaloproteinase de matrix

MS: *Multiple Sclerosis* – Esclerose Múltipla

MyD88: *Myeloid differentiation primary response gene 88*

n: número de animais

ng: nanogramas

NSAID: *nonsteroidal anti-inflammatory drug* – droga anti-inflamatória não-esteroidal

p: probabilidade

PBS: *phosphate buffered saline* – tampão fosfato de salina

pg: picogramas **PGE$_2$:** prostaglandin E_2 - prostaglandina E_2

PGHS: *prostaglandin H synthase endoperoxidase* - prostaglandinas endoperoxidases H sintases

PMA: *phorbol 12-myristate 13-acetate*

PKA: *phosphokinase A* – fosfoquinase A

RICD: *restimulation-induced cell death* – morte celular induzida por re-estimulação

rpm: rotações por minuto

RPMI-1640: *Roswell Park Memorial Institute*

s.c. subcutâneo

seg: segundo

SPF: *specific pathogen free* – livre de patógenos específicos

TA: temperatura ambiente

tBID: *truncated BID* – BID truncado

TCR: *T cell receptor* – receptor de célula T

Tfh: *follicular helper T* – linfócito T auxiliar folicular

Th1: TCD4 *helper* tipo I – Linfócito TCD4 auxiliar tipo I

TLR4: *toll-like receptor 4* – receptor semelhante a Toll 4

Treg: células T reguladoras

WT: *wildtype* – selvagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....16
1.1 Considerações Gerais..... 16
1.2 Linfócitos TCD4.....16
1.2.1 Do desenvolvimento à ativação.....16
1.2.2 Controle da morte de LTCD4$^+$ por ACAD e AICD.....19
1.3 Controle Molecular da Apoptose.....20
1.4 Prostaglandina E_2 (PGE_2).....23
1.5 Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE).....25
2 OBJETIVO GERAL.....28
2.1 Metas específicas.....28
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....29
3.1 Animais.....29
3.2 Reagentes.....29
3.3 Indução da Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE).....29
3.4 Tratamento com indometacina.....31
3.5 Extração de células mononucleares do sistema nervoso central.....31
3.6 Histologia.....31
3.7 Marcação intracelular.....32
3.8 Imunofenotipagem das células infiltrantes no SNC.....33
3.9 Ensaio de proliferação.....34
3.10 ELISA.....34
3.11 Detecção de apoptose via anexina.....35
3.12 Diferenciação de linfócitos TCD4$^+$.....35
3.12.1 Cultura celular.....35
3.12.2 Anticorpos e citocinas recombinantes.....35
3.12.3 Purificação e ativação de linfócitos TCD4.....37
3.12.4 Diferenciação in vitro de linfócitos TCD4 em culturas Th1, Th2, Th17 ou iTreg.....37
3.12.5 Citometria de fluxo.....38
3.12.6 Marcação intracelular para o fator de transcrição FOXP3.....39
3.13 ELISPOT.....39
3.14 Análises Estatísticas.....40

4 RESULTADOS.....41
4.1 Tratamento com indometacina reduz progressão da EAE.....41
4.2 Caracterização da doença.....44
4.3 Efeito da indometacina na proliferação x morte.....54
4.4 Indometacina altera geração de linfócitos efetores.....58
5 DISCUSSÃO.....64
6 CONCLUSÕES.....72
REFERÊNCIAS.....73

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais

O sistema imune é um sistema de reconhecimento, formado por moléculas, células, órgãos e tecidos, que tem como função manter a homeostasia do organismo e pode ser dividido em imunidade inata e adaptativa. As respostas imunológicas na imunidade adaptativa começam com o reconhecimento do antígeno pelos linfócitos específicos que resulta na ativação, proliferação e diferenciação dessas células em subtipos celulares ideais para cada tipo de resposta. Na fase efetora, essas células diferenciadas se encarregam da eliminação do antígeno ou do reservatório deste. Ao final desse processo, há uma fase de contração das células efetoras e sobrevivência de células de memória que responderão de forma mais rápida e eficaz em um segundo contato com o mesmo antígeno.

Durante qualquer tipo de resposta imune, é importante que haja um balanço entre proliferação e morte celular para garantir a homeostasia. O aumento do processo de morte e/ou redução da proliferação pode resultar, por exemplo, em quadros de imunodeficiência ou aumento de infecções crônicas, enquanto uma falha no processo de morte e/ou aumento da proliferação pode levar ao desenvolvimento de doenças autoimunes e tumores. Uma vez que este desequilíbrio entre morte e proliferação pode resultar em uma série de disfunções, investigar os mecanismos fisiológicos envolvidos na sobrevivência dessas células *in vivo* e a possibilidade de modular essa sobrevivência em diferentes condições fisiopatológicas é de grande importância para a área da imunologia.

1.2 Linfócitos TCD4

1.2.1 Do desenvolvimento à ativação

Os linfócitos T CD4 são células da imunidade adaptativa que desempenham um papel fundamental na resposta imunológica, uma vez que através de diferentes sinais são capazes de regular a atividade de outras células, sendo frequentemente chamados de T *helper* ou T auxiliares. Assim como as outras células circulantes no sangue, os linfócitos T têm sua origem na medula óssea a partir de células-tronco hematopoéticas que se diferenciam em precursores mieloides e precursores linfoides que, por sua vez, se diferenciam em células *natural killer*, linfócitos B e linfócitos T. Os linfócitos T, ainda imaturos, migram para o timo (timócitos)

onde passam por um processo de amadurecimento com formação do receptor TCR (*T cell receptor*), expressão do coreceptor CD3 e o direcionamento para linhagens que expressam em sua superfície apenas CD4 ou CD8. Durante o amadurecimento eles também passam por um processo de Tolerância Central, em que linfócitos T capazes de reconhecer antígenos próprios com alta afinidade/avidez morrem, como uma forma de prevenir que não existam linfócitos maduros na periferia capazes de reagir com moléculas próprias. Ao deixarem o timo estes linfócitos estão sujeitos a uma nova onde de regulação, denominada de Tolerância Periférica, novamente para garantir que as respostas conduzidas por esses linfócitos se mantenham sob controle. Entretanto, como os mecanismos imunológicos são sempre passíveis de falha, a quebra da Tolerância Central e/ou Periférica pode resultar no desenvolvimento de doenças autoimunes (1).

Uma vez maduros, os linfócitos *naïves* ou virgens circulam entre o sangue, a linfa e os órgãos linfoides secundários até serem ativados. Essa ativação é mediada por um contato direto com células apresentadoras de antígenos (APCs, do inglês, *antigen-presenting cells*) e depende basicamente de três sinais. O primeiro é dado pelo reconhecimento de um peptídeo, apresentado via MHC de classe II no caso dos linfócitos TCD4, pelo linfócito que possui um TCR específico para ele. O segundo é resultado da interação entre moléculas denominadas de coestimuladoras, sendo elas CD28 nos linfócitos e B7.1 (CD80) e B7.2 (CD86) nas APCs. É importante também que haja a participação de moléculas de adesão necessárias para estabilizar o contato entre as células durante a sinapse imunológica. Por fim, o terceiro sinal é fornecido por citocinas secretadas pelas APCs e reconhecidas por receptores de alta afinidade expressos nos linfócitos, que induzem sinais bioquímicos intracelulares que modificam o comportamento dessas células. Uma vez ativados, os linfócitos $TCD4^+$ proliferam e se diferenciam em diferentes subtipos ou subpopulações (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh e Treg). Essa diferenciação é determinada pelo padrão de citocinas pelas quais estes linfócitos são estimulados e caracterizada pela expressão de fatores de transcrição-chaves e pela secreção de citocinas de assinatura (2).

A secreção de IL-12 leva a diferenciação para Th1 caracterizado pela ativação do fator de transcrição T-bet e secreção de IFN-γ, TNF-α e IL-2, e envolvido nas respostas à microrganismos intracelulares (bactérias e vírus) e doenças autoimunes (3). Th2 é induzido pela secreção de IL-4 e indução de GATA-3 com liberação de IL-4, IL-5 e IL-13, e participa das respostas à helmintos e de reações alérgicas, como a asma (4). Th17, outra subpopulação já bem descrita atualmente, é associada à resposta à bactérias extracelulares e fungos e à patologias autoimunes, sendo induzida pela presença de TGF-β e IL-6 que ativam o fator

ROR-γt, responsável pela secreção de IL-17 e IL-22 (3, 5, 6, 7). Apesar da IL-22 ser secretada por Th17, uma subpopulação chamada de Th22 com secreção predominante dessa citocina foi mais recentemente descrita e parece estar relacionada à inflamações de pele (8).

Outra subpopulação que tem ganhado destaque na literatura são as células T foliculares (Tfh). Definidas pela expressão do fator de transcrição Bcl5 e secreção de IL-21, estão estrategicamente localizadas próximas aos linfócitos B nos centros germinativos de tecidos linfóides e são importantes para a troca de classe de anticorpos (9). Por fim, nas células T reguladoras (Treg) a complexidade aumenta devido a grande heterogeneidade dessa subpopulação. De forma mais abrangente, as Treg expressam o fator de transcrição FOXP3 e podem derivar do timo durante o amadurecimento dos linfócitos T (Treg naturais) ou serem induzidas na periferia na presença de TGF-β (Treg induzidas). As Treg secretam TGF-β e IL-10, e podem ser caracterizadas pela expressão de algumas moléculas em sua superfície, tais como CD25, CD5 e CTLA4 (10). Há também um subtipo de Treg, as Tr1 (*T regulatory cells 1*) (11) , induzidas por IL-10 e que secretam altas quantidades dessa citocina, que não expressam FOXP3. Diferente de outras subpopulações, as Treg possuem função supressora, controlando a resposta imune das demais subpopulações de linfócitos T e contribuindo, por exemplo, para que não ocorra o desenvolvimento de doenças autoimunes (10, 12, 13, 14).

Embora esses subtipos de linfócitos $TCD4^+$ tenham sido reportados, inicialmente, como subpopulações distintas, a plasticidade entre essas células vêm sendo cada vez mais discutida, e está claro no momento que o fenótipo delas pode mudar no decorrer das respostas imunológicas de acordo com o microambiente em que as células se encontram (13, 14). A heterogeneidade das células é um fator que pode explicar parcialmente a natureza plástica dos subtipos celulares. Um exemplo disso é que embora algumas citocinas sejam seletivamente produzidas por certos subtipos, muitas são amplamente secretadas. A IL-10, por exemplo, inicialmente reconhecida como uma citocina do padrão Th2, pode ser produzida por Th1, Th2, Treg e uma variedade de células da imunidade inata (13, 14).

Linfócitos Th-17 podem com freqüência começar a produzir IFN-γ. Células Treg podem perder a expressão de FOXP3 e adquirir um potencial patogênico produzindo citocinas pró-inflamatórias como IL-4, IFN-γ e IL-17. Estas células mostraram-se bem plásticas quando cultivadas sob condições que favoreçam Th1 ou Th17. O fator de transcrição-chave de uma determinada subpopulação pode ser necessário para a diferenciação dessa célula, mas não suficiente. FOXP3, por exemplo, é necessário para a diferenciação de Treg, mas não é suficiente para induzir completamente o fenótipo desta. Além disso, mesmo na ausência de

FOXP3 muitas funções das Treg permanecem normais. Da mesma maneira, a ausência de T-bet não impede a diferenciação para Th1. As células Th17 também parecem ser bem instáveis e podem ser reprogramadas para produzir citocinas do padrão Th1 e Th2 (15).

Os processos de ativação e diferenciação dos linfócitos T, descritos acima, são fundamentais para o desenvolvimento de uma resposta imunológica, entretanto, mecanismos de controle são indispensáveis para o perfeito funcionamento do sistema imune. É preciso haver a eliminação de células autorreativas geradas durante o desenvolvimento linfocitário e a formação das respostas, bem como a contração da população de linfócitos ativados na periferia após o término de uma reposta.

Durante esta fase de contração das respostas, grande parte das células ativadas morrem por apoptose que pode ser desencadeada por dois mecanismos diferentes: ACAD (*activated T cell autonomous death*) e AICD (*activation induced cell death*). A ACAD é desencadeada na ausência de fatores de crescimento/sobrevivência, e depende da proteína pró-apoptótica BIM, enquanto a AICD é dependente de um constante re-estímulo da célula e mediada pela interação FAS/FASL (16, 17, 18, 19, 20).

1.2.2 Controle da morte de LTCD4$^+$ por ACAD e AICD

No início de uma resposta imune a um determinado antígeno sinais dados a partir do complexo TCR, de coestimuladores e de fatores de crescimento, como a IL-2, favorecem a expressão de proteínas antiapoptóticas da família BCL-2. Essas proteínas promovem a sobrevida do linfócito e subsequente proliferação celular, importante para um adequado desenvolvimento da resposta ao antígeno. Com a eliminação deste e o encerramento da resposta ocorre uma diminuição dos fatores de crescimento no microambiente e, consequentemente, um aumento da expressão de proteínas pró-apoptóticas da família BCL-2, sobretudo BIM (*Bcl-2 interacting mediator*), resultando na indução de ACAD. BIM é uma molécula capaz de ativar outras proteínas pró-apoptóticas e/ou bloquear proteínas anti-apoptóticas, ambas da família BCL-2, e induzir apoptose. O processo de ACAD está mais frequentemente associado a respostas agudas, nas quais o antígeno é eliminado em pouco tempo (21, 22). Recentemente, Michael Lenardo e colaboradores sugeriram outro nome para esse tipo de morte celular: morte induzida pela retirada de citocinas (CWID, do inglês, *cytokine withdrawal-induced death*) (23). Contudo, a designação ACAD ainda continua sendo a mais utilizada e a escolhida para abordar do assunto neste trabalho.

Por outro lado, quando há persistência do antígeno no organismo e o desenvolvimento de uma resposta crônica, a constante re-estimulação do complexo TCR/CD3 por este antígeno culmina na redução dos níveis de c-FLIP (antiapoptótico) associada ao aumento de FASL (pró-apoptótico), desencadeando o processo conhecido como AICD. Inicialmente descrito em hibridomas de linfócitos T e posteriormente em outros linfócitos, a AICD pode ocorrer de forma autócrina, ou seja, quando FASL interage com FAS na mesma célula ou de forma parácrina, quando FASL interage com FAS na superfície de uma célula adjacente (24, 25, 26).

Os mesmos pesquisadores que sugeriram um nome alternativo para ACAD, também o fizeram para AICD. Michael Lenardo e colaboradores chamam atenção para o fato de que nem sempre a ativação da célula resulta em morte celular e, por isso, sugeriram a denominação "morte celular induzida por re-estímulação" (RICD - *restimulation-induced cell death*) para caracterizar a morte que ocorre em linfócitos T maduros após constantes re-estímulos do TCR quando o antígeno se torna persistente. Entretanto, neste trabalho, tal processo será referido como AICD (23).

É importante chamar atenção para o fato de que esses mecanismos ocorrem de forma dinâmica durante as respostas imunológicas. Assim, quando o antígeno é rapidamente eliminado, BIM é ativado e apoptose nos linfócitos T. Por outro lado, se o antígeno persiste por mais tempo, os níveis de FASL aumentam nessas podendo levar a morte das mesmas de forma autócrina ou parácrina, ou então a morte das células dendríticas via FAS. Se as células dendríticas morrem resultando na eliminação dos antígenos residuais, os linfócitos T ativam BIM e morrem como em uma resposta aguda (16). Tanto a ativação de BIM na ACAD quanto a indução de FASL na AICD vão resultar na indução de apoptose nas células, embora a via utilizada por essas moléculas seja diferente.

1.3 Controle Molecular da Apoptose

A apoptose é a forma de morte celular mais bem estudada e caracterizada, e apresenta algumas alterações morfológicas e moleculares bem marcantes, tais como retração do citoplasma, formação de pregas na membrana plasmática, fragmentação do DNA e exposição da fosfatidilserina na face externa da membrana plasmática (27). Existem duas vias de apoptose bem estabelecidas: a via intrínseca e a via extrínseca (**Figura 1**). A via intrínseca é ativada por sinais que causam estresse intracelular, como irradiação, microrganismos e agentes quimioterápicos, e é dependente da mitocôndria, enquanto a via extrínseca é ativada pela interação de receptores de morte (FAS, TNF-R1, TRAIL-R1 e TRAIL-R2) com seus

respectivos ligantes (FASL, TNF-α e TRAIL, respectivamente) e pode ocorrer com ou sem a participação desta organela (34).

A mitocôndria é uma organela regulada por uma família de proteínas conhecida como família BCL-2 (*B-cell CLL/Lymphoma 2)*. Essa família é composta por proteínas anti e pró-apoptóticas cuja classificação é baseada na função e nos domínios de homologia ao BCL-2 (*BH – BCL-2-homology domain*). As proteínas antiapoptóticas (BCL-2, BCL-$X_{L,}$ BCL-W, MCL-1, A1) possuem os domínios BH1-BH4 e são responsáveis pelo bloqueio da permeabilização da membrana externa mitocondrial, chamada de MOMP (do inglês, *mitochondrial outer membrane permeabilization*). As proteínas pró-apoptóticas são subdivididas em dois grupos: o das moléculas efetoras e o das proteínas BH3-*only*. As moléculas efetoras (BAX e BAK) possuem os domínios BH1-BH3 e são responsáveis pela formação dos poros na membrana externa mitocondrial e conseqüente indução do MOMP, o que possibilita a liberação de diversos fatores pró-apoptóticos. As proteínas BH3-*only* (BID, BIM, BAD, BIK, PUMA, NOXA, BMF e HRK) funcionam como sensores de estresse intracelular e sinais pró-apoptóticos. O balanço entre proteínas anti- e pró-apoptóticas é de suma importância para a sobrevivência/morte das células (21, 34).

A via extrínseca é ativada por receptores de morte (DRs, do inglês, *death receptors*) que pertencem à família dos receptores TNF (*tumor necrosis factor receptor*), enquanto seus respectivos ligantes pertencem a família do TNF-α. FAS (CD95/APO-1), o protótipo dos DRs, é uma proteína transmembrana do tipo I, expressa constitutivamente na maioria dos tecidos celulares e caracterizada pela presença de um a seis domínios ricos em cisteína nas suas porções extracelulares que medeiam sua interação com FASL (CD95L/Apo-1L), uma proteína transmembrana do tipo II, expressa constitutivamente em apenas alguns tecidos ou algumas células e induzido por estímulos específicos na maioria destes (28, 29, 30).

A oligomerização entre trímeros de FAS e FASL na superfície da célula inicia uma cascata de sinalização intracelular que começa com o recrutamento de proteínas adaptadoras chamadas FADD (*fas-associated death domain*) que se ligam ao FAS através do domínio de morte (DD, do inglês, *death domain*) e à pró-caspase-8/-10 através do domínio efetor de morte (DED, do inglês, *death efector domain*), formando um complexo denominado DISC (*death-inducing signaling complex*). Esse complexo permite a autoativação da pró-caspase-8 e -10 (28, 29). Outra molécula envolvida nesse processo é a proteína c-FLIP (*cellular FLICE-like inhibitory protein)* que apresenta um DED muito semelhante ao DED da pró-caspase-8 competindo com a mesma por uma ligação ao FADD no complexo DISC e inibindo, dessa forma, o processo de apoptose (28).

Após ativação da via extrínseca, a caspase-8 pode seguir dois caminhos: ativar diretamente as caspases efetoras -3, -6 e -7 ou realizar uma amplificação mitocondrial pela clivagem da proteína BID, uma proteína pró-apoptótica BH3-*only* (*BH3-interacting domain death agonist*), fazendo um link entre a via extrínseca e a intrínseca. Após clivagem a molécula de tBID (do inglês, *truncated BID*), assim como BIM, é capaz de promover a agregação de BAX (*BCL-2-associated X protein*) e BAK (*BCL-2 antagonist killer 1*) que participam da indução do MOMP permitindo a liberação de diversos fatores do espaço intermembrana para o citosol. Dentre esses fatores, podemos citar o citocromo c que se associa a uma molécula de ATP (*adenosine triphosphate*) e a uma proteína adaptadora chamada de APAF-1 (*apoptotic protease-activating factor 1)*. Esta, por sua vez, se liga à pró-caspase-9 através do domínio CARD (*caspase-recruitment domain*) formando outro complexo, denominado de apoptossomo, que permite a autoativação da pró-caspase-9. A caspase-9, por sua vez, ativa as caspases efetoras -3, -6 e -7. (30, 31). Essas caspases são as responsáveis pela clivagem de diversos substratos que resultará no fenótipo característico de uma célula em apoptose. Quando a via extrínseca resulta em uma morte direta com clivagem das caspases efetoras pela caspase-8, as células são denominadas de células Tipo I. Por outro lado, quando há uma amplificação mitocondrial pela clivagem de BID, as células são denominadas de células Tipo II (31, 32, 33).

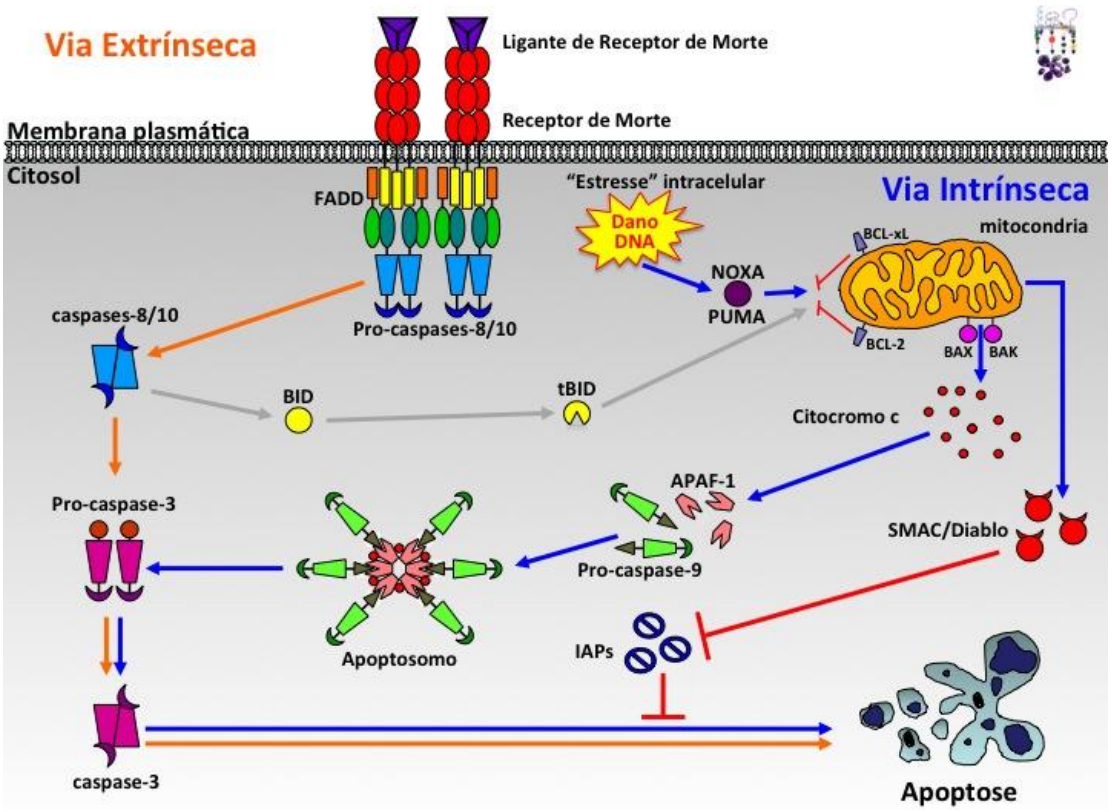


Figura 1. *Apoptose.* Sinalização do processo de apoptose pela via extrínseca, induzida através da interação entre receptores de morte e seus respectivos ligantes e pela via intrínseca, ativada por estresses intracelulares. Ambas as vias resultam numa via comum de morte, na qual há ativação da caspase-3 que resulta na apoptose. A comunicação com a mitocôndria durante a via extrínseca é realizada pela proteína BID da família BCL-2. Fonte: Adaptado de (34) por Gustavo Amarante-Mendes.

Quando há redução da apoptose em linfócitos pode ocorrer linfoacumulação e geração de doenças autoimunes, o que pode ser visto em síndromes como o ALPS (do inglês, *autoimmune lympho proliferative syndrome*) decorrentes de mutações, por exemplo, no gene FAS (ALPS tipo I) ou na caspase-10 (ALPS tipo II) (35, 36). Além disso, camundongos *knockouts* para FAS (*lpr*) e/ou FASL (*gld*) também apresentam problemas de linfoacumulação e patologias autoimunes (16). Por outro lado, o aumento excessivo da apoptose observada em síndromes como a AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*) resulta em um estado de imunodeficiência que torna o indivíduo susceptível a muitas infecções oportunistas (37).

Dentro do contexto de apoptose, resultados previamente publicados pelo nosso grupo (38) demonstraram que APCs estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS), que sinaliza via TLR4 (*toll-like receptor 4*) e MyD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*), secretam fatores solúveis capazes de proteger linfócitos T do processo de AICD induzido por re-ativação com anticorpos anti-CD3 *in vitro*. A prostaglandina E_2 (PGE_2) foi identificada como um dos fatores solúveis sendo, por si só, capaz de inibir de forma significativa o processo de AICD.

1.4 Prostaglandina E_2 (PGE_2)

A PGE_2 é o principal mediador lipídico liberado durante as respostas inflamatórias e contribui para os estados de hiperalgesia, pirexia e dilatação arterial com aumento do fluxo sanguíneo para o tecido inflamado e formação de edema. A PGE_2 também é liberada de forma basal em condições fisiológicas e participa de alguns processos homeostáticos, tais como manutenção da integridade da mucosa gástrica e da pressão sanguínea (39, 40).

Produzida por muitas células do corpo, incluindo APCs (macrófagos, células dendríticas), o metabolismo geral das prostaglandinas tem início com a liberação do ácido araquidônico proveniente de fosfolipídeos de membrana pela ação da enzima fosfolipase A_2 em resposta a estímulos hormonais e inflamatórios, por exemplo. O ácido araquidônico pode ser metabolizado por duas enzimas chamadas de ciclo-oxigenase-1 e -2 (COX-1 e COX-2) ou de prostaglandinas endoperoxidases H sintases (PGHS-1 e PGHS-2). De maneira bem geral, COX-1 é expressa constitutivamente na maioria dos tecidos e está relacionada à produção

basal de prostaglandinas em resposta a estímulos hormonais, enquanto COX-2 é induzida em processos inflamatórios/infecciosos ou situações de estresse. O metabolismo do ácido araquidônico, seja por COX-1 ou -2, resulta na produção de PGH_2, uma prostaglandina altamente instável e rapidamente metabolizada por algumas enzimas específicas que dão origem as cinco principais classes de prostaglandinas: PGD_2, PGE_2, $PGF_2\alpha$, PGI_2 e TXA_2 (41).

As prostaglandinas recém produzidas são rapidamente secretadas e atuam nas células próximas ao seu local de origem através do reconhecimento por receptores específicos presentes nas membranas plasmáticas. A PGE_2, por exemplo, exerce suas atividades através da ligação a um ou a uma combinação de 4 subtipos de receptores EP (do inglês, *E prostanoid*). Estes receptores, denominados EP1, EP2, EP3 e EP4, estão acoplados a diferentes proteínas G o que explica, em parte, os efeitos antagônicos da PGE_2 no sistema imune (42, 43). Os receptores EP2 e EP4, acoplados a proteína Gs, ativam a adenilato ciclase, uma enzima transmembrana que catalisa a conversão de ATP em cAMP que atua como segundo mensageiro e ativa a PKA que, por sua vez, ativa o fator de transcrição CREB (*cAMP responsive element binding factor)*. Em contraste, o receptor EP3, acoplado a proteína Gi, inibe o aumento de cAMP e, por conseqüência, inibe a adenilato ciclase. Já EP1, acoplado a Gq, é responsável pelo aumento dos níveis de cálcio intracelular. Dados da literatura mostram uma ampla distribuição desses quatro receptores em células do sistema imune tanto em macrófagos e células dendríticas quanto em linfócitos T e B (43). Devido a variedade de receptores, a expressão destes nas células e a concentração de PGE_2 disponível, esta pode ter uma ação tanto pró-inflamatória ou pró-apoptótica quanto anti-inflamatória ou anti-apoptótica (38, 44).

Dentro do modelo estudado pelo nosso grupo, foi demonstrado que a PGE_2 atua de forma anti-apoptótica via EP2 e 4 aumentando os níveis de cAMP (*cyclic adenosine monophosphate*), ativando PKA (*protein kinase A*) e resultando na repressão de FASL (38). O que ainda não está descrito é a forma através da qual ocorre essa modulação. Por outro lado, resultados preliminares sugerem a participação do repressor ICER, alvo de estudo de outro trabalho do nosso grupo. Outro ponto importante é se essa modulação ocorre em condições fisiopatológicas *in vivo* e qual seria a importância desta. Uma condição fisiopatológica mediada por linfócitos $TCD4^+$ é a Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE), o modelo murino da Esclerose Múltipla. Como na EAE a sobrevivência de clones potencialmente autorreativos leva ao desenvolvimento da doença e está descrito que pacientes com Esclerose Múltipla e camundongos com EAE apresentam aumento da expressão de COX-2 e PGE_2, esse

foi o modelo escolhido neste trabalho para estudo da modulação da sobrevivência de linfócitos TCD4 pela PGE_2 (63).

1.5 Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE)

A Esclerose Múltipla (MS, do inglês, *Multiple Sclerosis*) é considerada uma doença autoimune crônica clássica mediada por células T que atacam o sistema nervoso central (CNS – *central nervous system*) e causam inflamação, desmielinização e perda axonal com consequentes déficits neurológicos. O diagnóstico é baseado na história médica do paciente e no exame físico. Entretanto, ainda não está claro quais são os fatores desencadeantes da MS. É possível que haja o envolvimento de infecções, adjuvantes ou apresentação endógena de antígenos próprios (45). Além disso, pode haver uma pré-disposição genética (46) e influência de fatores ambientais, como vitamina D e exposição à luz do sol. Uma vez induzida a patologia autoimune, esta pode ser mantida por fatores imunológicos e neurológicos (45, 47, 48). O diagnóstico geralmente é feito na terceira e quarta década de vida por imagens de áreas cerebrais. Infelizmente, não há cura para a Esclerose Múltipla e o tratamento para amenização dos sintomas é feito por três classes de drogas: interferon-β1a, interferon-β1b e acetato de glatiramer foram aprovados pelo FDA para uso no tratamento de pacientes com MS remitentes-recorrentes (49, 50).

Pacientes com Esclerose Múltipla geralmente apresentam uma síndrome inicial clinicamente isolada, seguida por uma série de eventos clínicos subagudos que passam espontaneamente, chamados de casos remitentes-recorrentes. Embora na maioria dos casos os pacientes retornem as funções neurológicas próximas do normal no final de cada episódio, após um período variável de tempo pode haver uma progressão irreversível da doença, chamada de MS secundária progressiva. Mais raramente, o indivíduo pode entrar diretamente em um surto primário progressivo, caracterizado por uma progressão clínica desde o início da doença sem passar por remissões e recaídas (48).

No intuito de facilitar a compreensão e o estudo da MS são utilizados modelos animais da doença. Um desses modelos chamado de Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE), foi descoberto e desenvolvido em 1930 por Rivers *et al* (51). Alternativamente, a EAE também era chamada de Encefalomielite Alérgica Experimental, mas o termo “alérgico” foi sendo substituído pelo autoimune devido às descobertas da etiologia da doença nos últimos anos (52, 53, 54). A EAE é considerada o protótipo de doenças autoimunes mediadas por linfócitos T, sendo amplamente utilizada para estudo das respostas imunológicas. É induzida

em animais susceptíveis através da imunização ativa por proteínas da mielina ou pela transferência passiva de linfócitos $TCD4^+$ específicos para esses antígenos.

Dependendo do modelo utilizado, a EAE pode se desenvolver de forma aguda, remitente-recorrente e pode ter uma progressão primária ou secundária. Apesar do modelo ter sido descoberto e desenvolvido em 1930, só em 1980 que as células T foram descobertas como sendo os principais mediadores, por causa de experimentos com transferência adotiva de linfócitos T para induzir a doença em ratos e camundongos (55). Esses modelos apresentam diferentes características no fenótipo da doença, na histopatologia e em seus mediadores celulares e moleculares, e assim podem apresentar semelhanças e distinções da MS.

A literatura descreve o modelo de EAE induzido em camundongos C57BL/6, susceptíveis ao peptídeo MOG_{35-55}, como um modelo crônico, em que as manifestações começam em 10 a 15 dias após a imunização inicial, o pico da doença cerca de sete dias após início dos sinais, seguido de uma fase de remissão, durante a qual há uma recuperação parcial desses sinais. Nesse modelo, denominado de monofásico, a doença se manifesta em apenas um pico e depois os camundongos se mantém na fase de remissão. Cerca de 75-80% de incidência é normalmente esperado. Para indução da EAE nesse modelo os camundongos são imunizados com emulsão contendo o peptídeo específico de MOG e CFA e recebem duas injeções de toxina de *Bordetella pertussis* (56). O CFA (do inglês, *Complete Freund's Adjuvant*) é uma mistura do óleo de adjuvante incompleto de Freund (IFA, do inglês, *Incomplete Freund's Adjuvant*) com *Mycobacterium tuberculosis* inativada por calor. Essa bactéria é reconhecida por receptores de reconhecimento padrão (PRRs, do inglês, *pattern recognition receptors*), sobretudo TLR7 e TLR9, presentes em células da imunidade inata, tais como macrófagos e células dendríticas, e favorece a quebra da tolerância periférica (57, 58). A toxina de *Bordetella pertussis* auxilia na quebra da barreira hematoencefálica possibilitando a infiltração dos linfócitos T autorreativos no sistema nervoso central (53, 59). Alguns estudos demonstraram que ela também parece aumentar a produção de IFN-γ por LT encefalitogênicos.

Dados da literatura sugerem a participação da via FAS/FASL (60, 61, 62) e da via da PGE_2 (63, 64) no desenvolvimento da EAE, o que sugere que este modelo é ideal para o estudo da modulação da sobrevivência de linfócitos $TCD4^+$ pela PGE_2.

Dentro do contexto da EAE, a hipótese do nosso trabalho é que a PGE_2 liberada por células apresentadoras de antígeno durante a fase de indução da doença seja capaz de modular positivamente a sobrevivência dos linfócitos $TCD4^+$ autorreativos.

2 OBJETIVO GERAL

✓ Investigar se é possível modular a sobrevivência de linfócitos $TCD4^+$ em um modelo de doença autoimune (EAE) através da inibição da síntese de PGE_2.

2.1 Metas específicas

✓ Inibir a produção de PGE_2 através do tratamento com indometacina, em camundongos submetidos à EAE e observar se há alteração da progressão/desenvolvimento da doença;

✓ Caracterizar o desenvolvimento da EAE nos camundongos tratados com indometacina e com o veículo;

✓ Investigar se o tratamento com indometacina é capaz de causar alteração na sobrevivência, proliferação e morte dos linfócitos TCD4+ autorreativos.

✓ Analisar se a ausência de PGE_2 altera o padrão de resposta gerado durante a EAE.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Os camundongos C57BL/6 fêmeas, de aproximadamente 8 semanas, utilizados nos experimentos e mantidos em condições *SPF* (*specific pathogen free*), foram fornecidos pelo CEDEME (Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia) da UNIFESP (Universidade Federal de São Paulo). Todos os procedimentos experimentais realizados com esses camundongos estão de acordo com as Normas de Cuidados a Animais de Laboratório e com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP (Protocolo 0248/09), analisados e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA). Esses procedimentos também estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) em 18.04.2012 (protocolo número 206). Todos os camundongos foram alojados em microisoladores mantidos em estantes ventiladas com livre acesso à água e comida, em ambiente com temperatura e umidade controladas e ciclo claro/escuro de 12 h.

3.2 Reagentes

A PGE_2 e os anticorpos anti-EP1-4 foram adquiridos da Cayman Chemicals Co. (Ann Arbor, MI, EUA). A indometacina e a *Bordetella pertussis* foram adquiridas da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O peptídeo MOG_{35-55} foi adquirido da ProteinMax. O anticorpo anti-CD3 (clone 2C11), derivado do hibridoma denominado 145-2C11 (65) foi produzido e purificado no laboratório.

3.3 Indução da Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE)

Os camundongos foram imunizados ativamente por via subcutânea no flanco com 150 µg de MOG_{35-55} emulsificado em CFA contendo 4 mg/mL de *Mycobacterium tuberculosis* (H37Ra, Difco). Adicionalmente, os camundongos receberam duas injeções contendo 150 ng

de toxina de *Bordetella pertussis*, administradas por via intraperitoneal, 0 e 48 h após imunização. Esse modelo de indução crônica de EAE está representado na **Figura 1**.

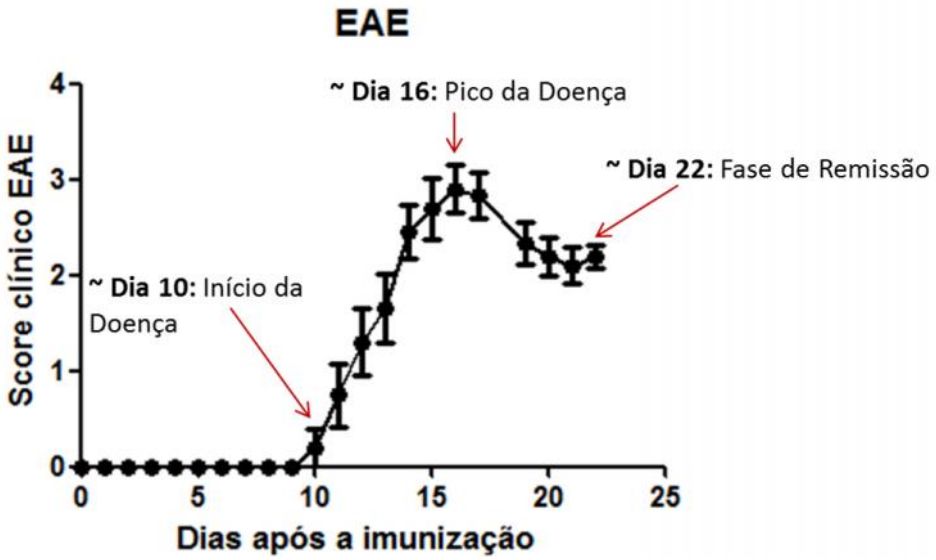


Figura 2. *Modelo de indução crônica de EAE.* A literatura descreve o modelo de EAE induzido em camundongos C57BL/6, sensíveis ao peptídeo MOG_{35-55}, como um modelo crônico, em que os sintomas começam a aparecer entre o 10º e o 15º dia, o pico da doença ocorre cerca de sete dias após início dos sintomas, seguido de uma fase de remissão, durante a qual há uma recuperação parcial dos sintomas. Nesse modelo, denominado monofásico, a doença apresenta somente um pico.

O desenvolvimento da doença foi acompanhado diariamente e os camundongos foram classificados de acordo com o escore detalhado na **Tabela 1**. Os animais que, porventura, receberam grau 4 foram avaliados 2 vezes ao dia e na ocorrência de três graus 4 consecutivos foram submetidos à eutanásia em câmara de CO_2.

Tabela 1. *Escores dos sinais clínicos dos camundongos após a indução da EAE.* Descrição dos parâmetros de avaliação do escore clínico dos camundongos organizados em uma pontuação dada diariamente a cada camundongo individualmente, após indução de EAE, conforme descrito nos materiais e métodos.

Score	Sinais Clínicos
0	Ausência de sinais;
0,5	Flacidez da cauda;
1	Perda do tônus da cauda;
1,5	Alteração na forma de caminhar;
2	Leve fraqueza dos membros posteriores e dificuldade para se endireitar sozinho;
2,5	Severa fraqueza dos membros posteriores e incapacidade de se endireitar sozinho;
3	Paralisia parcial dos membros posterioes;
3,5	Paralisia total dos membros posteriores;
4	Paralisia total dos membros posteriores e parcial dos anteriores.

3.4 Tratamento com indometacina

Camundongos C57BL/6 fêmeas, de aproximadamente 8 semanas, imunizados com o peptídeo MOG_{35-55} para indução de EAE (vide materiais e métodos acima), foram separados em dois grupos, com n variando de acordo com o experimento. Um dos grupos (grupo experimental) foi tratado por via intraperitoneal durante cinco dias, a partir do dia da imunização, com 5 mg/kg (aproximadamente 100 µg/animal) de indometacina, enquanto o outro grupo (grupo controle) recebeu apenas o veículo (0,4% de etanol em DMEM). A indometacina foi diluída na concentração estoque de 50 mg/mL em etanol, no dia da imunização, aliquotada e armazenada a -20 °C. Para cada dia de tratamento, uma alíquota foi descongelada e diluída em DMEM.

3.5 Extração de células mononucleares do sistema nervoso central

Os camundongos com escore médio representativos do grupo foram submetidos à eutanásia em câmara de CO_2 no pico da EAE do grupo controle com 250 mg/kg de ketamina e 500 mg/kg de xilazina. Após incisão até a altura do coração, foi realizada a perfusão com PBS gelado. Encéfalo e medula espinhal foram coletados, processados e mantidos em meio HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) ou DMEM suplementado com 2 mg/mL de colagenase D (Roche®) e incubados em estufa a 37 °C. Após 45 min, as amostras foram dissociadas mecanicamente em *cell strainer* (70 µm), lavadas com HBSS e centrifugadas a 300xg por 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspendido em 5 mL de percoll à 37% e gentilmente despejado sobre 5 mL de percoll à 70%. Os tubos foram centrifugados a 900xg por 20 min a 4 °C sem parada. A bainha de mielina foi retirada e as células mononucleares foram coletadas da nuvem formada, lavadas e contadas em câmara de Neubauer para marcação de citometria de fluxo.

3.6 Histologia

Os camundongos foram sacrificados no pico da EAE e perfundidos com 20 mL de PBS (*phosphate buffered saline*) gelado e depois com 4% de paraformaldeído (PFA) diluído em PBS pH7.4. Após perfusão, o encéfalo e a coluna vertebral foram retirados e mantidos em solução de PFA por 2 h sob agitação. Após esse período, a coluna vertebral foi desmembrada

para retirada da medula espinhal. Os órgãos foram lavados com PBS por 1 h sob agitação, mantidos em álcool à 70% e enviados ao setor de histologia para coloração com hematoxilina e eosina (H&E) para verificação do infiltrado celular e com *luxol fast blue* da desmielinização.

3.7 Marcação intracelular

As células mononucleares extraídas do sistema nervoso central foram ressuspendidas em meio RPMI 1640 [suplementado com: 10% FCS; 2 mM GlutaMax^{TM}-I; 1 mM piruvato de sódio; 0,1 mM de solução de aminoácidos não essenciais MEM; solução de vitaminas MEM 1x; 100 U/mL penicilina; 100 μg/mL estreptomicina (Gibco, Life Technology); e 50 μM β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) e estimuladas com PMA (50 ng/mL) e ionomicina (1 μM) na presença de brefeldina A (1x) e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO_2. Após 4 h, as células foram lavadas com PBS contendo brefeldina A e centrifugadas por 300xg por 5 min a 4 °C. Em seguida, as células foram incubadas a 4°C com *Fc block* por 15 min e lavadas com PBS, seguida por mais uma centrifugação a 300xg por 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as células foram marcadas para superfície com anti-mouse CD3 (conjugado com PE-Cy7) e anti-mouse CD4 (APC-eFluor®780) por 20 min a 4 °C protegidos da luz. Após lavagem e centrifugação, as células foram fixadas e permeabilizadas (kit da eBioscience) para marcação intracelular com anti-IL-17A (PerCP-Cy5.5), anti-IFN-γ (APC) e anti-GM-CSF (PE), lavadas, centrifugadas e ressuspendidas em PBS para análise por citometria de fluxo no citômetro FACSCanto (BD – Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA).

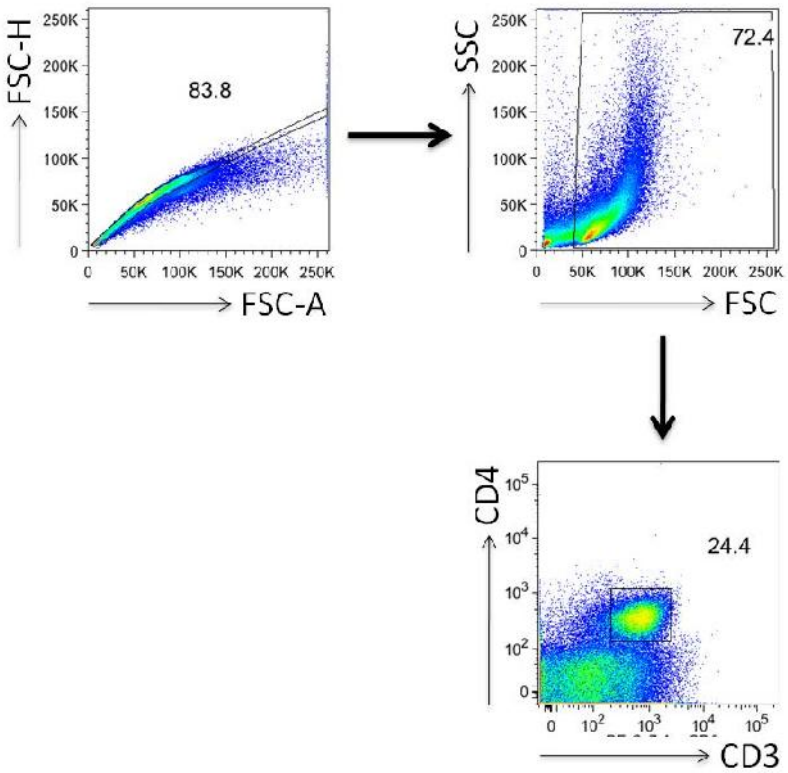


Figura 3. *Estratégia de gate para análise das células por citometria de fluxo.* As células foram analisadas por citometria de fluxo, primeiro através da exclusão dos *doublets* pela janela de FSC-H por FSC-A. Dentro dos *singlets*, as células foram separadas por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), excluindo-se os *debris*. Finalmente, quando foi o caso, foi realizada a dupla marcação com CD3 e CD4 para análise de alterações específicas dentro da população de linfócitos $TCD4^+$.

3.8 Imunofenotipagem das células infiltrantes no SNC

As células mononucleares extraídas do sistema nervoso central foram contadas e $5x10^5$ células foram ressuspendidas em meio RPMI 1640 [suplementado com: 10% FCS; 2 mM GlutaMax™-I; 1 mM piruvato de sódio; 0,1 mM de solução de aminoácidos não essenciais MEM; solução de vitaminas MEM 1x; 100 U/mL penicilina; 100 μg/mL estreptomicina (Gibco, Life Technology); e 50 μM β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich)] e centrifugadas a 240xg por 5 min a 4 ºC. As amostras foram lavadas em 200 μL de PBS enriquecido com 5% de FCS e 0,1% de azida sódica. Após nova centrifugação, o precipitado foi ressuspendido em 20 μL da mesma solução contendo anti-mouse CD3 (PE-Cy7) e anti-CD4 (APC), anti-mouse CD45 (PE-Cy5) e anti-mouse CD11b (FITC) e incubado a 4 ºC no escuro. Após 30 min, as células foram lavadas duas a três vezes com 200 μL de PBS contendo 0,1% de azida sódica. Utilizando o kit Foxp3 (ebioscience) as células foram fixadas, permeabilizadas e marcadas com anti-Foxp3 (PE) durante 30 min. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo

através do aparelho FACSCanto (BD – Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA) e analisadas com o software Flowjo (Tree Star, Ashland, Oregon).

3.9 Ensaio de proliferação

Os linfonodos drenantes (inguinais e poplíteos) foram coletados, dissociados mecanicamente em *cell strainer*, lavados com meio HBSS e centrifugados a 300xg por 5 min a 4 °C. $5x10^6$ células foram ressuspendidas em 1 mL de PBS com 1 μM de CellTrace™ Violet (Cell Proliferation Kit, ThermoFisher Scientific) e incubadas em estufa a 37 °C e 5% de CO_2 protegidas da luz. Após 20 min, as amostras com *cell trace* foram neutralizadas com meio por mais 5 min e centrifugadas a 300xg por 5 min a 4 °C. As células foram ressuspendidas no volume adequado e plaqueadas em placas de 96 de fundo U, em seguida, foram estimuladas com 10 e 100 μg/mL de MOG_{35-55} ou 10 μg/mL de $OVA_{323-339}$ e incubadas em estufa a 37 °C e 5% de CO_2 por 3 dias. A diluição do *cell trace* nas células-filhas foi analisada por citometria de fluxo através do aparelho FACSCanto (BD – Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA).

3.10 ELISA

Os linfonodos drenantes (inguinais e poplíteos) foram coletados e dissociados mecanicamente em *cell strainer*, lavados com meio HBSS e centrifugados a 300xg por 5 min a 4 °C. Após contagem na câmara de Neubauer, foram plaqueadas $3x10^5$ células em 240 μL/poço e, em seguida, estimuladas com 10 e 100 μg/mL de MOG_{35-55} ou 10 μg/mL de $OVA_{323-339}$ e incubadas em estufa à 37 °C e 5% CO_2 por 2 dias. Após esse período, a placa foi centrifugada a 1.700 rpm por 5 min a 4 °C e o sobrenadante foi coletado e transferido para outra placa, armazenada em freezer -80 °C. A análise das citocinas de interesse foi realizada através da técnica de ELISA sanduíche, utilizando-se um kit comercial da eBioscience, segundo protocolo do fabricante. Em resumo, 100 μL de cada amostra foram incubados com os anticorpos específicos para IFN-γ, IL-17, IL-10 e IL-2 em uma placa de 96 poços revestida de anticorpos anti-IgG. Após adição do substrato enzimático, a densidade ótica das amostras foi determinada por leitura a 412 nm em espectrofotômetro e a quantificação foi realizada através de curvas-padrão, sendo o resultado convertido a pg/mL.

3.11 Detecção de apoptose via anexina

Após os respectivos tratamentos, as células foram centrifugadas a 240xg por 5 min à 4 °C e lavadas uma vez em tampão de anexina [10 mM HEPES; 150 mM NaCl; 5 mM KCl; 1 mM $MgCl_2$; e 1,8 mM $CaCl_2$]. O sobrenadante foi descartado e as células foram incubadas com 2 g/mL de anexina V-FITC em 100 µL de tampão por 30-40 min no escuro a TA. Em seguida, foram adicionados 200 µL de tampão de anexina a cada amostra e realizada a análise por citometria de fluxo através do aparelho FACSCalibur ou FACSCanto (BD – Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA)

3.12 Diferenciação de linfócitos T $CD4^+$

3.12.1 Cultura celular

Todas as culturas de células foram mantidas em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), $NaHCO_3$ [40mMO, 1 mM NaH_2PO_4], 1 mM piruvato de sódio, solução de vitaminas MEM 1X, solução de aminoácidos MEM essenciais e não-essenciais 1X, 2 mM L-glutamina, 55 µM β-mercaptoetanol, 10 mM HEPES, 100.000 U/L penicilina e 100 mg/L estreptomicina. Todos os reagentes supracitados foram adquiridos da Gibco. Todas as culturas foram mantidas em estufa a 37 °C e 5% de CO_2.

3.12.2 Anticorpos e citocinas recombinantes

A lista de anticorpos utilizados, nesta parte do projeto, para diferentes finalidades e seus respectivos clones e fabricantes estão organizados na **Tabela 2**. Todas as marcações foram realizadas segundo as especificações sugeridas pelo fabricante.

Tabela 2: *Lista de anticorpos utilizados.* Lista apresentando a especificidade, os clones e os fabricantes/empresas dos anticorpos utilizados para ativação das células, diferenciação e imunofenotipagem por citometria de fluxo.

Especificidade	Clone	Empresa	Finalidade
Anti-CD3	17A2	eBioscience	Citometria
Anti-B220	RA3-6B2	BD Pharmingen	Citometria
Anti-CD4	GK1.5	BD Pharmingen	Citometria
Anti-CD8	53-6.7	BD Pharmingen	Citometria
Anti-IFN-γ	XMG1.2	BD Pharmingen	Citometria
Anti-IL-4	11B11	eBioscience	Citometria
Anti-IL-17	eBio17B7	eBioscience	Citometria
Anti-CD44	IM7	eBioscience	Citometria
Anti-CD62L	MEL-14	eBioscience	Citometria
Anti-CD69	H1.2F3	eBioscience	Citometria
Anti-CD25	PC61.5	eBioscience	Citometria
Anti-Foxp3	FJK-16s	eBioscience	Citometria
Anti-IFN-γ	XMG1.2	Amersham Biosciences	Neutralização
Anti-IL4	11B11	Amersham Biosciences	Neutralização
Anti-CD3	2C11	Produzido pelo nosso grupo	AICD
Anti-CD28	37.51	Pharmingen	Ativação
Anti-IgG	Policlonal	Cappel	Revestimento

Os anticorpos neutralizantes utilizados nas culturas de células foram purificados a partir do sobrenadante de cultura de hibridomas em colunas de sefarose por imunoglobulinas do tipo IgG segundo as especificações do fabricante (GammaBind G SepharoseTM, Amersham Biosciences). As citocinas recombinantes utilizadas IL-2, IL-4, IFN-γ, IL-12, IL-6 e TGF-β

foram todas obtidas da empresa PeproTech e as concentrações utilizadas nas culturas estão descriminadas no protocolo de diferenciação *in vitro* dos linfócitos T CD4.

3.12.3 Purificação e ativação de linfócitos T CD4

Os linfócitos T CD4 foram obtidos a partir de linfonodos periféricos (cervicais, braquiais, axilares e inguinais) de animais C57BL/6 *naive* e purificados por coluna magnética de seleção negativa (Dynabeadsl) segundo as especificações do fabricante. Os graus de pureza obtidos após a purificação foram analisados por citometria de fluxo através de marcações com anticorpos monoclonais específicos para CD3, B220, CD4 e CD8. Após a purificação, as células foram cultivadas na concentração inicial de 10^6 células/mL de meio em poços de placas de cultura previamente tratados com 0,3 mg/mL de anti-IgG por 40 min a 37 ºC. Aos poços foram adicionados 1 µg/mL de anticorpos anti-CD3 e anti-CD28 para o estímulo, além de citocinas recombinantes e anticorpos neutralizantes indicados para cada condição. As placas foram mantidas em estufa a 37 ºC e 5% de CO_2. Em um dos experimentos de diferenciação, foi adicionada uma única dose de prostaglandina E_2 (PGE_2) nas concentrações de 10^{-6} e 10^{-8} M no momento da ativação com anti-CD3 e anti-CD28.

3.12.4 Diferenciação in vitro de linfócitos T CD4 em culturas Th1, Th2, Th17 ou iTreg

Para obtenção de células diferenciadas nas subpopulações Th1, Th2, Th17 ou iTreg, 10^6 linfócitos T CD4 *naive* foram obtidos e ativados *in vitro* com anti-CD3 e anti-CD28 de maneira idêntica à descrita no item anterior, na presença de citocinas e anticorpos neutralizantes que promovam condições polarizantes para cada um destes perfis conforme descrito a seguir: para a diferenciação Th1 → utilizamos 5 ng/mL de IFN-γ, 5 ng/mL de IL-12 e 20 µg/mL de anticorpo anti-IL-4; para a diferenciação Th2 → utilizamos 50 ng/mL de IL-4 e 100 µg/mL de anticorpo anti-IFN-γ; para a diferenciação Th17 → utilizamos 5 ng/mL de TGF-β, 50 ng/mL de IL-6, 20 µg/mL de anticorpo anti-IL-4 e 100 µg/mL de anticorpo anti-IFN-γ. Para a diferenciação iTreg → utilizamos 5 ng/mL de TGF-β, 10 µM de ácido retinóico (RA), 20 µg/mL de anticorpo anti-IL-4 e 100 µg/mL de anticorpo anti-IFN-γ.

A partir do segundo dia de cultura, as células foram expandidas dobrando-se diariamente a área e o volume das culturas através da transferência das mesmas para placas

com o dobro da área e adição de mesmo volume de meio DMEM fresco contendo IL-2 recombinante (20 U/mL) para Th1, Th2 e iTreg ou em meio fresco livre de IL-2 para Th17.

No sexto dia de diferenciação a confirmação da polarização das culturas foi realizada por marcação intracelular para as citocinas específicas de cada um dos perfis efetores ou para o fator de transcrição FOXP3 para as culturas iTreg. Uma vez obtidas as populações de linfócitos T CD4 diferenciadas para os diferentes perfis, separamos $1x10^6$ células de cada perfil para a marcação intracelular de citocinas, $2x10^5$ células por poço para a indução de AICD com 1 µg/mL de anti-CD3 estimuladas na presença ou não de 10^{-6} M de PGE_2 por 18 h e posterior marcação com Anexina V-FITC; e $5x10^5$ células por poço estimuladas com 1 µg/mL de anti-CD3 com e sem 10^{-6} M de PGE_2 pelo período de 4 h para extração de RNA com TRIZOL.

3.12.5 Citometria de fluxo

A verificação dos percentuais de ativação dos linfócitos foi realizada através de marcações com anticorpos específicos para CD44, CD25 e CD62L, somente para o experimento em que as diferenciações foram realizadas na presença ou não de prostaglandina.

Depois das diferenciações, foram realizadas as marcações intracelulares de citocinas. Para isso, $2x10^6$ células foram lavadas e ressuspendidas em 3 mL de meio DMEM com 10% SFB e estimuladas com 10 nM de PMA e 1 µM de ionomicina por 6 h em estufa a 37 ºC e 5% de CO_2. Após as 4 h iniciais do estímulo, foi adicionada às culturas 10 µg/mL de brefeldina para promover a estocagem das citocinas produzidas no citoplasma da célula. Após o estímulo, as células foram lavadas e fixadas por 16 h em uma solução de PBS contendo 2% de paraformaldeído.

Após a fixação, as células foram permeabilizadas em tampão de permeabilização [PBS contendo 1% de BSA e 0,5% de saponina] por 5 min a temperatura ambiente (T.A.). Após a permeabilização, foram adicionados anticorpos monoclonais conjugados a fluorocrômos para a marcação de IFN-γ, IL-4 ou IL-17 e incubados por 40 min a T.A. no escuro. As marcações foram realizadas em um volume final de 100 µL de tampão de permeabilização e as concentrações finais utilizadas de cada anticorpo foram as sugeridas pelo fabricante. Após as marcações, a células foram lavadas 1X em tampão de permeabilização 1X.

3.12.6 Marcação intracelular para o fator de transcrição FOXP3

Para averiguar o resultado da diferenciação para o perfil iTreg, $2x10^6$ células foram marcadas com anticorpos anti-CD25 segundo as especificações sugeridas pelo fabricante e posteriormente centrifugadas a 400xg por 7 min a 4 ºC e ressuspendidas em solução de fixação e permeabilização (*Fix/Perm buffer*) do kit para marcação intracelular para FOXP3 (eBioscience) por 16 h. Após este período, as células foram centrifugadas novamente e ressuspendidas na solução de permeabilização (*Perm. buffer*) do mesmo kit e posteriormente marcadas por 40 min através da adição de anticorpos específicos contra FOXP3. A marcação foi realizada por 40 min utilizando a concentração de anticorpo sugerida pelo fabricante à 4 ºC, no escuro. Após a marcação, as células foram lavadas 2X em solução *Perm. buffer* e ressuspendidas em tampão de FACS para a aquisição.

Para todos os experimentos realizados, as células foram adquiridas em citômetro de fluxo Becton Dickinson FACScan e analisadas utilizando o software FlowJo.

Para o ajuste das marcações em todos os casos foi utilizado um controle não marcado exceto para a marcação com o anticorpo FOXP3, em que foram utilizadas linfócitos T CD4 *naive* marcados para a remoção do *background* da marcação.

3.13 ELISPOT

A técnica de ELISPOT foi utilizada para detecção de células produtoras de IFN-γ e IL-17. Em uma placa de nitrocelulose de 96 poços (Multiscreen HA Millipore) foram adicionados 60 µL por poço de PBS estéril contendo 10 ng/mL do anticorpo de captura monoclonal anti-IFN-γ e anti-IL-17 de camundongo. A placa foi incubada a TA por 24 h. No dia seguinte, foram realizadas três lavagens com 100 µL de RPMI em condições estéreis e feito o bloqueio com 100 µL de RPMI contendo 10% de SFB por 2 h a TA. As células respondedoras foram obtidas dos linfonodos drenantes de camundongos C57BL/6J, após indução de EAE, tratados com indometacina ou não, e ressuspendidas em uma concentração final de 10^6cels/mL em RPMI suplementado [1% de NEA (*non essencial aminoacids*); 1% de L-glutamina, 0,1% de β-mercaptoetanol, 1% de piruvato de sódio, 1% de penicilina e estreptomicina, 10% de SFB e 30 U/mL de IL-12 recombinante humana]. As células foram colocadas nos respectivos poços e incubadas durante 24 h a 37 °C e 5% CO_2 em condições estáticas. Após este processo, a placa foi lavada 3 vezes com PBS e 5 vezes com PBS 0,05% de Tween. Em seguida, foram adicionados 75 µL por poço do anticorpo biotinilado diluído

em PBS 0,05% de Tween 20 na concentração final de 2 µg/mL. A placa foi incubada a 4 °C por 24 h. No dia seguinte, a placa foi lavada 5 vezes com 0,05% de PBS Tween 20 e 3 vezes com PBS. Em seguida, foram adicionados 100 µL por poço de PBS 0,05% Tween 20 (contendo o complexo estreptavidina-peroxidase em uma diluição 1:800). A placa foi incubada durante 2 h a TA e lavada por 3 vezes com 0,05% de PBS Tween 20 e 5 vezes com PBS. Finalmente, a placa foi revelada com 100 µL por poço da solução de revelação [50 µM de Tris-HCL pH 7.5, 1 mg/mL de DAB + 1 µL/mL de H_20_2 durante cerca de 15 min. A reação foi interrompida e a placa lavada com água corrente. A placa foi secada a TA e os "spots" quantificados.

3.14 Análises Estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio de um *software* computacional chamado *Graphpad Prism*, da companhia *Graphpad Software Incorporation* (San Diego, Califórnia, USA) versão 5.01. Os dados foram apresentados como média +/- erro padrão da média. Para análise do escore clínico da EAE, as diferenças estatísticas foram determinadas por análise. Os valores de $p<0,05$ foram considerados significativos.

4 RESULTADOS

4.1 Tratamento com indometacina reduz progressão da EAE

Inicialmente, para estudar a modulação da sobrevivência de linfócitos $TCD4^+$ pela PGE_2 em um contexto de doença autoimune utilizamos um modelo de indução crônica de EAE. Nesse modelo, camundongos C57BL/6 ($H\text{-}2^b$) fêmeas foram imunizados com o peptídeo $MOG_{35\text{-}55}$ emulsificado com adjuvante completo de *Freund* (CFA) e receberam duas injeções intraperitoneais (i.p.) de toxina de *Bordetella pertussis*, 0 e 48 h após a imunização (66).

O grupo experimental foi tratado com indometacina somente pelos 5 primeiros dias contando a partir do dia da imunização (dia 0), enquanto o grupo controle foi tratado apenas com o veículo pelo mesmo período. A indometacina é um anti-inflamatório não-esteroidal (NSAID, do inglês, *nonsteroidal anti-inflammatory drug*) do tipo não seletivo, ou seja, bloqueia tanto COX-1 quanto COX-2 inibindo a produção de PGE_2 e das demais prostaglandinas (67).

Os camundongos foram acompanhados diariamente por 32 dias para avaliação dos escores clínicos. Analisando o grupo controle na **Figura 4** podemos concluir que a indução da EAE desenvolveu-se conforme o padrão esperado, sendo que o início dos sinais foi no 9º dia, o pico da doença no 18º e a fase de remissão por volta do 22º dia, com uma incidência de 95% de animais com EAE. Entretanto, o que realmente nos chama atenção nessa curva é que o tratamento com indometacina somente pelos cinco primeiros dias foi capaz de reduzir a progressão da EAE de forma estatisticamente significativa durante todo o curso da doença (do 10º ao 32º dia).

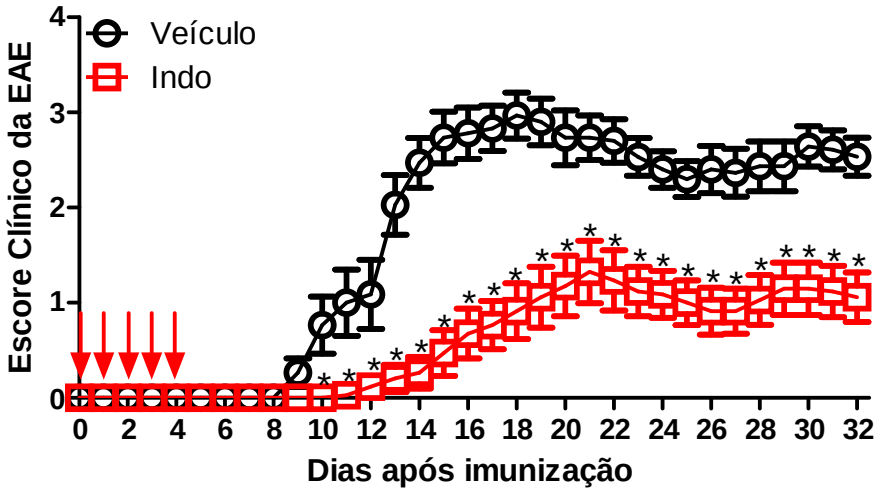


Figura 4. *Indometacina reduz progressão da EAE.* Trinta e quatro camundongos C57BL/6 selvagens (WT) foram imunizados com peptídeo MOG_{35-55}/CFA, conforme descrito nos materiais e métodos. O grupo experimental (quadrados abertos em vermelho) foi tratado i.p. com 5 mg/kg (~ 100 μg/animal) de indometacina por cinco dias a partir do dia da imunização (dia 0). O grupo controle (círculos abertos em preto) foi administrado apenas com o veículo (0,4% de etanol em DMEM). Os grupos foram acompanhados diariamente para avaliação do escore clínico da doença. Os resultados foram analisados pelo teste de Mann Whitney U. Os dados representam a média do escore clínico da EAE ± erro padrão da média (n=17 animais por grupo). Os valores de *p<0,05 foram considerados significativos. Dados cumulativos de dois experimentos independentes e representativos de três experimentos independentes.

Podemos observar que embora ambos os grupos tenham desenvolvido a doença, apresentando início dos sinais em dias próximos, o pico da doença ocorreu em dias diferentes, dia 21 no grupo experimental e dia 18 no grupo controle. Além disso, se analisarmos os dados obtidos a partir desta curva e plotados na **Tabela 3** podemos perceber que mesmo comparando a severidade da doença no respectivo dia do pico de cada grupo, esta ainda é estatisticamente menor no grupo tratado com indometacina. A incidência da doença também foi menor no grupo experimental com 65% (11 de 17) comparado a 95% (16 de 17) do grupo controle. Além disso, pelos dados da **Figura 4** é possível reparar que os camundongos tratados com indometacina entraram na fase de remissão voltando ao escore médio de 1, recuperando-se de forma qualitativamente melhor comparado aos camundongos do grupo controle que apresentaram escore médio de 2,5. É importante ressaltar que o tratamento com indometacina não levou os camundongos a óbito nem mesmo após meses de acompanhamento (dados não mostrados).

Tabela 3. *Características clínicas dos camundongos após indução da EAE nos grupos tratados.* A indução da EAE foi realizada conforme descrito nos materiais e métodos e os dados obtidos no gráfico da **Figura 3** foram plotados nesta tabela.

Grupos (Tratamentos)	Incidência da Doença[a] (%)	Severidade máxima[b] (média ± SD)	Dia do início da doença[c] (média ± SD)	Score clínico[d] (dia 18) (média ± SD)	Score clínico[e] (dia 21) (média ± SD)	Incidência da mortalidade[f] (%) (média ± SD)
Veículo	16/17 (95)	3,38 ± 0,29	12 ± 2	3,2 ± 0,46	2,9 ± 0,51	3/17 (18)
Indometacina	11/17 (65)	2,68 ± 0,64[g]	16 ± 3[h]	2,2 ± 0,75[h]	2,5 ± 0,61[g]	0/17 (0)

[a]Incidência de camundongos que desenvolveram sinais clínicos de EAE, do dia 0 ao 32º dia, do total de camundongos imunizados.
[b]Média da severidade máxima da doença, considerando apenas camundongos que apresentaram sinais clínicos
[c]Média do dia de início da doença
[d]Média do escore clínico no dia 18, dia do pico da doença no grupo tratado com o veículo.
[e]Média do escore clínico no dia 21, dia do pico da doença no grupo tratado com indometacina.
Incidência de camundongos que morreram, do total de camundongos imunizados.
p<0,01 comparado ao veículo, Teste Mann-Whitney U
p<0,001 comparado ao veículo, Teste Mann-Whitney U

Como a indometacina é uma droga da classe dos anti-inflamatórios, é prudente considerar que talvez ela esteja reduzindo a progressão da doença por estar controlando o processo inflamatório que se instala na fase efetora da doença. Assim para investigar se seu efeito estaria relacionado a uma redução da inflamação durante o desenvolvimento da doença, imunizamos três grupos com o peptídeo de MOG, conforme descrito anteriormente, sendo que dois grupos foram tratados com indometacina: o primeiro do dia 0 (dia da imunização) ao dia 5 (fase de ativação) e o segundo do dia 11 ao dia 15 (fase efetora) que corresponde ao início dos sinais clínicos e o grupo controle foi tratado apenas com o veículo. Através do gráfico da **Figura 5**, podemos observar que o tratamento com indometacina nos primeiros dias foi novamente capaz de reduzir significativamente a progressão da doença, porém quando adiamos o tratamento para a fase de início dos sinais, a indometacina conseguiu apenas atrasar levemente o grau do escore clínico da EAE, não apresentando efeito significativo sobre a doença, que atingiu os mesmos escores clínicos do grupo controle.

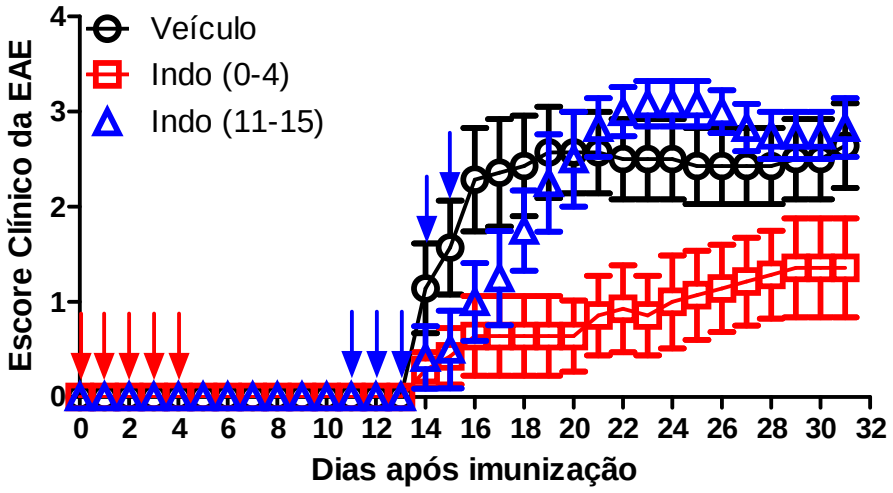


Figura 5. *Indometacina reduz progressão da EAE apenas quando administrada na fase de ativação da doença.* Vinte e um camundongos C57BL/6 selvagens (WT) foram imunizados com peptídeo MOG_{35-55}, conforme descrito nos materiais e métodos. Os grupo experimentais foram tratados i.p. com 5 mg/kg (~ 100 µg/animal) de indometacina por cinco dias: do dia 0-4 (quadrados abertos em vermelho) e do dia 11-15 (triângulos abertos em azul). O grupo controle (círculos abertos em preto) foi administrado apenas com o veículo (0,4% de etanol em DMEM). Os grupos foram acompanhados diariamente para avaliação do escore clínico da doença. Os resultados foram analisados pelo teste de Mann Whitney U. Os dados representam a média do escore clínico da EAE ± erro padrão da média (n=7 animais por grupo). Os valores de *$p<0,05$ foram considerados significativos.

Os dados apresentados até aqui, demonstram que o tratamento precoce com indometacina pelos cinco primeiros dias, e não após início dos sinais clínicos, foi capaz de reduzir a progressão da mesma de forma estatisticamente significativa por todo o curso da

doença, indicando que a indometacina está induzindo alguma alteração na fase de ativação da doença que tem um efeito que perdura ao longo dela.

4.2 Caracterização da doença

Uma vez demonstrado que o tratamento com indometacina sob determinadas condições foi capaz de reduzir a progressão da doença, o próximo passo foi a caracterização da mesma nos grupos tratados. Para isso, realizamos a indução de EAE e o tratamento com indometacina, conforme padronizado anteriormente, e acompanhamos os sinais clínicos diariamente até o pico da doença no grupo controle. Neste dia (~ dia 18), os camundongos foram submetidos à eutanásia e o sistema nervoso central foi utilizado para análise histológica.

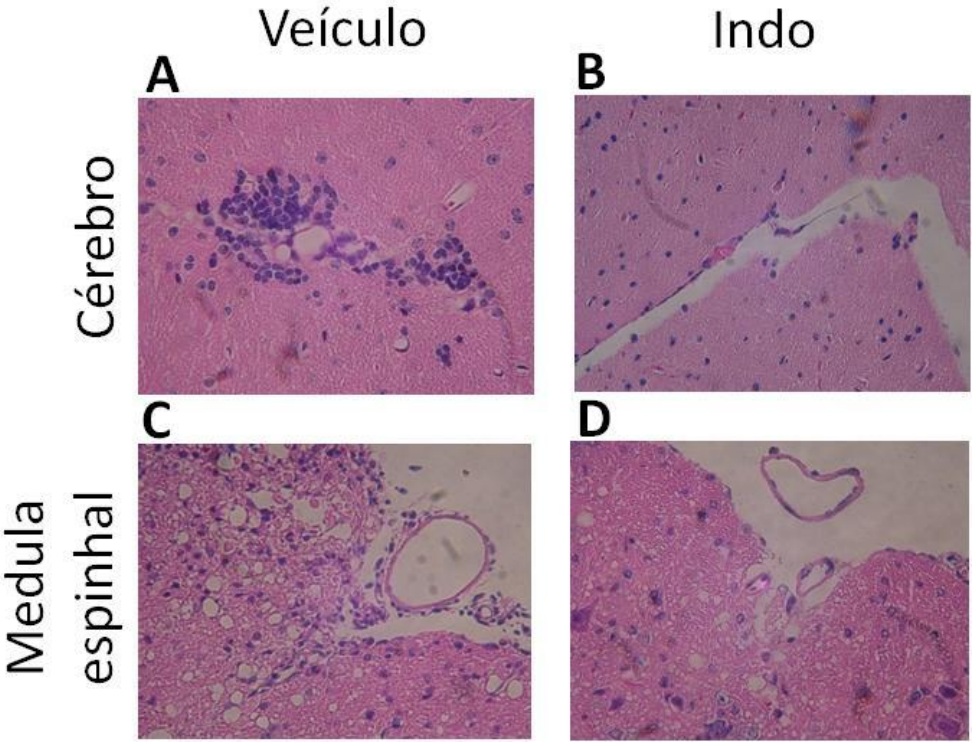


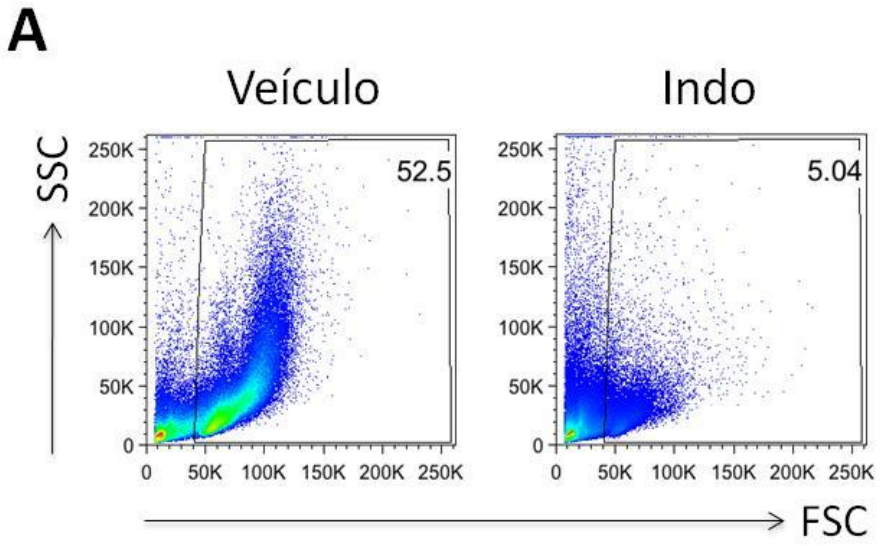
Figura 6. *Redução do infiltrado celular no sistema nervoso central pela indometacina.* A EAE foi induzida conforme descrito nos materiais e métodos e os animais foram submetidos a eutanásia no dia do pico (~ di 18) para análise histológica do infiltrado celular através da coloração com hematoxilina e eosina. A figura mostra uma marcação representativa para cada grupo. Corte do cérebro **(A)** e da coluna anterior da medula espinhal cervical (**C**) de camundongo tratado com veículo (0,4% de etanol em DMEM); aumento de 1000X. Corte de cérebro **(B)** e da coluna anterior da medula espinhal cervical (**D**) de camundongo tratado com indometacina (5 mg/kg); aumento de 100X Corte da coluna anterior da medula espinhal cervical.

Para observação do infiltrado celular, a medula espinhal (**Figura 6 C e D**) e o cérebro (**Figura 6 A e B**) de camundongos tratados com indometacina (**B e D**) ou com o veículo (**A e C**) com indometacina, foram corados com hematoxilina e eosina (HE ou H&E). A hematoxilina (azul arroxeado) é um corante básico que tem afinidade pelo núcleo que é ácido, enquanto a eosina (rosa) é um corante ácido e tem afinidade pelo citoplasma que é básico. Pela imagem, podemos perceber que há um menor infiltrado de células tanto no cérebro quanto na medula óssea com o tratamento com indometacina. Quando analisamos as imagens do cérebro, apesar da distribuição estar diferente – as células estão mais concentradas no veículo e mais dispersas na indometacina – podemos perceber uma menor quantidade de células.

Uma vez que a análise histológica nos permitiu identificar um infiltrado celular no veículo e uma redução deste na indometacina, o próximo passo foi caracterizar a composição deste infiltrado celular por citometria de fluxo. Para isso, foi realizada a indução de EAE e o tratamento com indometacina, conforme padronizado anteriormente, e avaliado o escore diariamente até ser identificado o dia do pico no grupo tratado com o veículo. Neste dia (~ dia 18), aqueles camundongos com escore próximo a média do grupo foram submetidos à eutanásia e foi realizada a retirada do sistema nervoso central (encéfalo e medula espinhal). Os órgãos foram picotados e incubados com 2 mg/mL de colagenase D para extração das células do parênquima cerebral e dissociados mecanicamente e depois, as células mononucleares foram separadas por gradiente de *percoll*. Durante a contagem dessas células na câmara de Neubauer, já pudemos perceber que o número total de células foi maior no grupo controle ($2{,}88 \times 10^6$ células) do que no grupo experimental ($1{,}23 \times 10^6$ células). Para marcação intracelular das citocinas, as células foram incubadas por 4 h em estufa, a 37 °C e 5% de CO_2 com 50 ng/mL de PMA (*phorbol myristate acetate*) e 1 µM de ionomicina, os quais ativam as células por induzir a ativação de PKC e o aumento dos níveis de cálcio intracelular, respectivamente. As células foram estimuladas na presença de brefeldina A que inibe o transporte das proteínas do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi, impedindo que sejam secretadas e favorecendo o acúmulo dentro das células a fim de que sejam reconhecidas pelos anticorpos de interesse.

Após incubação, as amostras foram marcadas com os respectivos anticorpos e adquiridas no citômetro de fluxo até a sua totalidade. Inicialmente, ao analisarmos os gráficos de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), podemos perceber que a maior parte das células obtidas dos animais tratados com indometacina morreu durante este pequeno período de incubação, revelando a sua fragilidade quando comparadas às células obtidas dos animais que

receberam o veículo. Enquanto que cerca de 50% das células do grupo controle encontram-se na região viável apenas 5% das células obtidas dos animais tratados encontram-se nesta região (**Figura 7A**). A partir desta janela, isolamos a população de linfócitos T $CD4^+$, através da dupla marcação com anticorpos anti-CD3 e anti-CD4. Enquanto no grupo controle a porcentagem de linfócitos $TCD4^+$ foi de aproximadamente 20%, a do grupo tratado foi de 10%. Ao calcularmos o número absoluto de células $TCD4^+$ obtidas do sistema nervoso central de animais controle e experimental, observamos uma redução estatisticamente significativa no grupo tratado com indometacina (**Figura 7B**).



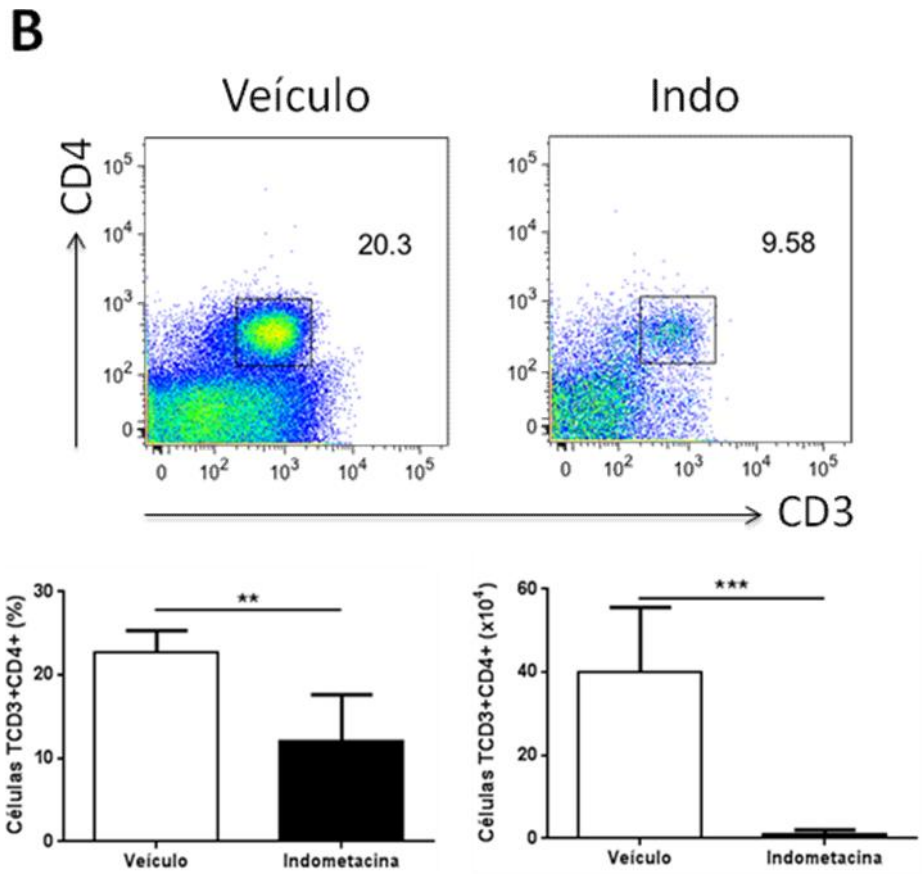


Figura 7. *Indometacina reduz número total de células mononucleares e linfócitos TCD4$^+$ no sistema nervoso central.* Células mononucleares foram isoladas do sistema nervoso central (encéfalo e medula espinhal) de camundongos após indução de EAE no dia do pico da doença no grupo controle (~ dia 18) e foram tratados com indometacina ou com o veículo, conforme descrito nos matérias e métodos. As células mononucleares foram estimuladas com 50 ng/mL de PMA e 1 µM de ionomicina na presença brefeldina A (1X) por 4 h em estufa a 37 ˚C e 5% de CO_2. **A** Na citometria de fluxo, as células foram separadas por FSC (tamanho) e SSC (granulosidade); **B** A população de linfócitos foram determinados através de marcação para CD3 e CD4. Os dados representam a média de cinco camundongos de cada grupo ± desvio padrão (SD). Os valores de **p<0,01 e ***p<0,001 foram considerados significativos.

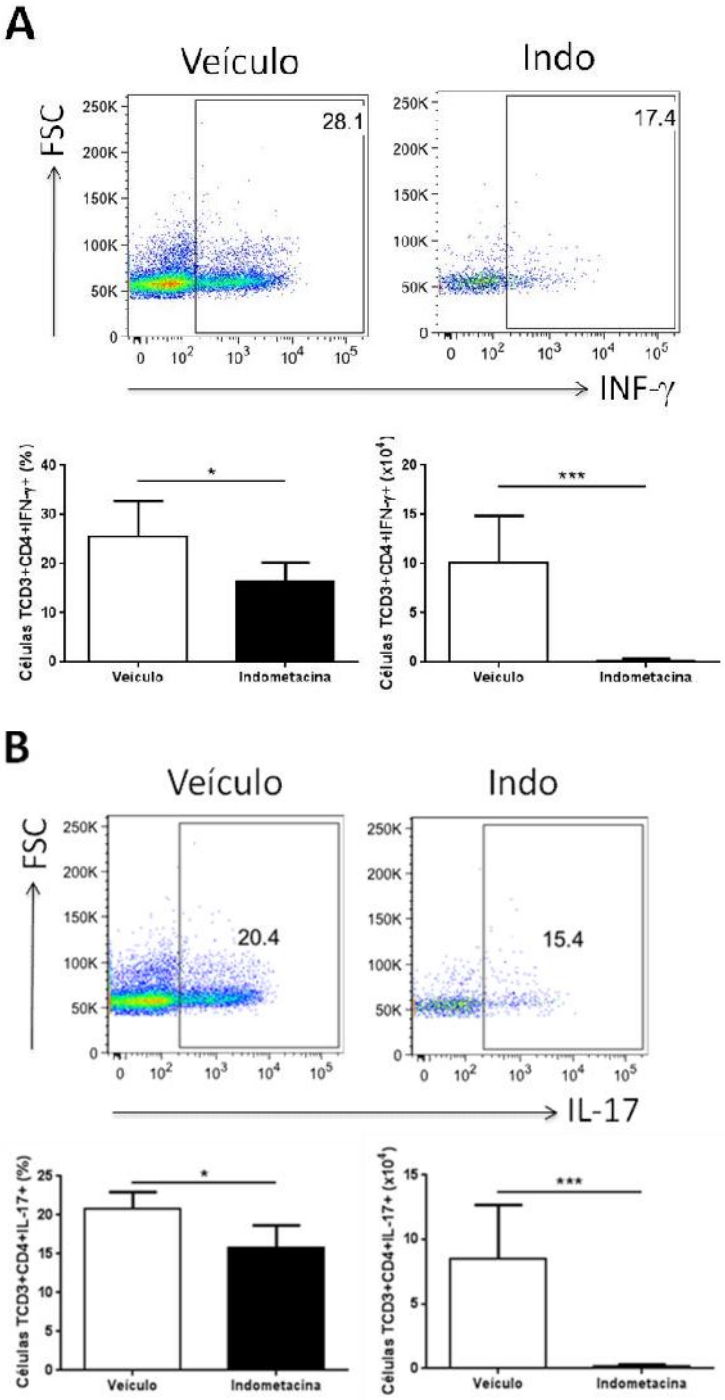


Figura 8: *Indometacina reduz proporção de linfócitos produtores de IFN-¥ e IL-17 no sistema nervoso central.* Células mononucleares foram isoladas do sistema nervoso central (encéfalo e medula espinhal) de camundongos após indução de EAE no dia do pico da doença no grupo controle (~ dia 18) e foram tratados com indometacina ou com o veículo. As células mononucleares foram estimuladas com 50 ng/mL de PMA e 1 µM de ionomicina na presença de brefeldina A (1X) por 4 h em estufa a 37 ˚C e 5% de CO_2. A estratégia dos *gates* está descrita nos materiais e métodos. **A** Porcentagem e número absoluto de linfócitos $TCD4^+$ produtores de IFN-γ. **B** Porcentagem e número absoluto de linfócitos TCD4+ produtores de IL-17. Os dados representam a média de cinco camundongos de cada grupo ± desvio padrão (SD). Os valores de *p<0,05 e ***p<0,001 foram considerados significativos. ns=não significativo.

Inicialmente, acreditava-se que os linfócitos encefalitogênicos eram do subtipo Th1, mas hoje sabemos que os linfócitos do subtipo Th17 parecem ser tão ou mais necessários para o desenvolvimento da doença (68). Para análise dessas subpopulações realizamos marcação intracelular para IFN-γ e IL-17, as citocinas de assinatura de Th1 e Th17, respectivamente, dentro da janela de linfócitos $TCD4^+$ (células positivas para CD3 e CD4). Podemos notar na **Figura 8A** e **B** que o tratamento com indometacina levou a redução, de forma estatisticamente significativa, da frequência dessas subpopulações bem como do número absoluto, como visto pela redução das células produtoras de IFN-γ e IL-17. Uma vez que atualmente discute-se muito a respeito da plasticidade entre as subpopulações de linfócitos (68), analisamos também a porcentagem de células que eram positivas tanto para IFN-γ quanto para IL-17, mas não encontramos diferença na frequência das células produtoras de ambas as citocinas (**Figura 9**). A diferença só pode ser constatada quando analisamos o número absoluto.

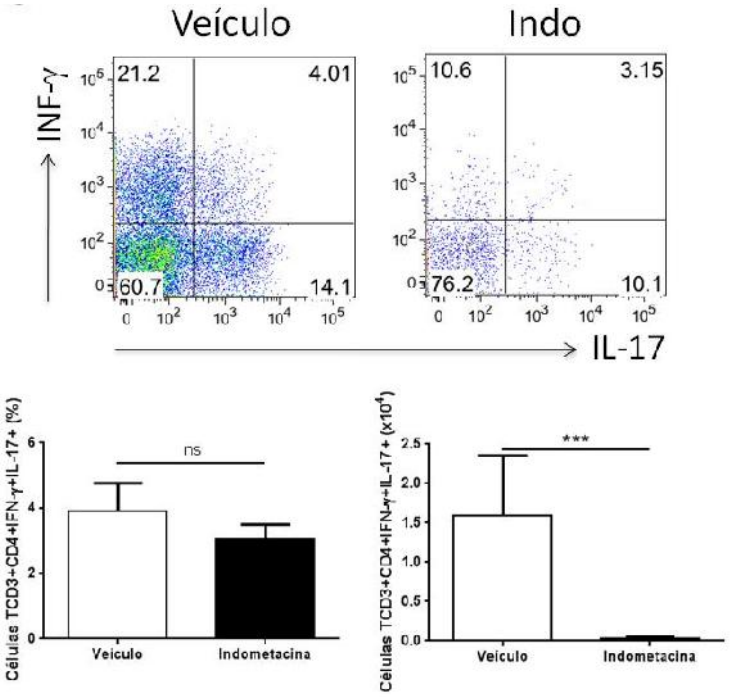


Figura 9: *Indometacina reduz proporção de linfócitos produtores de IFN-¥ e IL-17 no sistema nervoso central.* Células mononucleares foram isoladas do sistema nervoso central (encéfalo e medula espinhal) de camundongos após indução de EAE no dia do pico da doença no grupo controle (~ dia 18) e foram tratados com indometacina ou com o veículo. As células mononucleares foram estimuladas com 50 ng/mL de PMA e 1 µM de ionomicina na presença de brefeldina A (1X) por 4 h em estufa a 37 ˚C e 5% de CO_2. A estratégia dos *gates* está descrita nos materiais e métodos. Linfócitos $TCD4^+$ produtores de IFN-γ e IL-17. Os dados representam a média de cinco camundongos de cada grupo ± desvio padrão (SD). Os valores de *p<0,05 e ***p<0,001 foram considerados significativos. ns=não significativo.

Além do IFN-γ e da IL-17, foi descrito que o GM-CSF (*granulocyte macrophage - colony stimulating factor*) tem um papel fundamental no desenvolvimento da EAE (69); (70). Sendo assim, resolvemos investigar se o tratamento com indometacina resultaria na redução das células produtoras dessa citocina também. Como podemos observar na **Figura 8**, o grupo tratado apresentou redução, estatisticamente significativa, da frequência e do número absoluto de linfócitos produtores de GM-CSF. Enquanto a frequência de linfócitos produtores dessa citocina no veículo foi de 16,3%, na indometacina foi de 9,24%, mostrando uma redução de quase duas vezes na frequência dessas células, redução maior do que a encontrada para IFN-γ e IL-17.

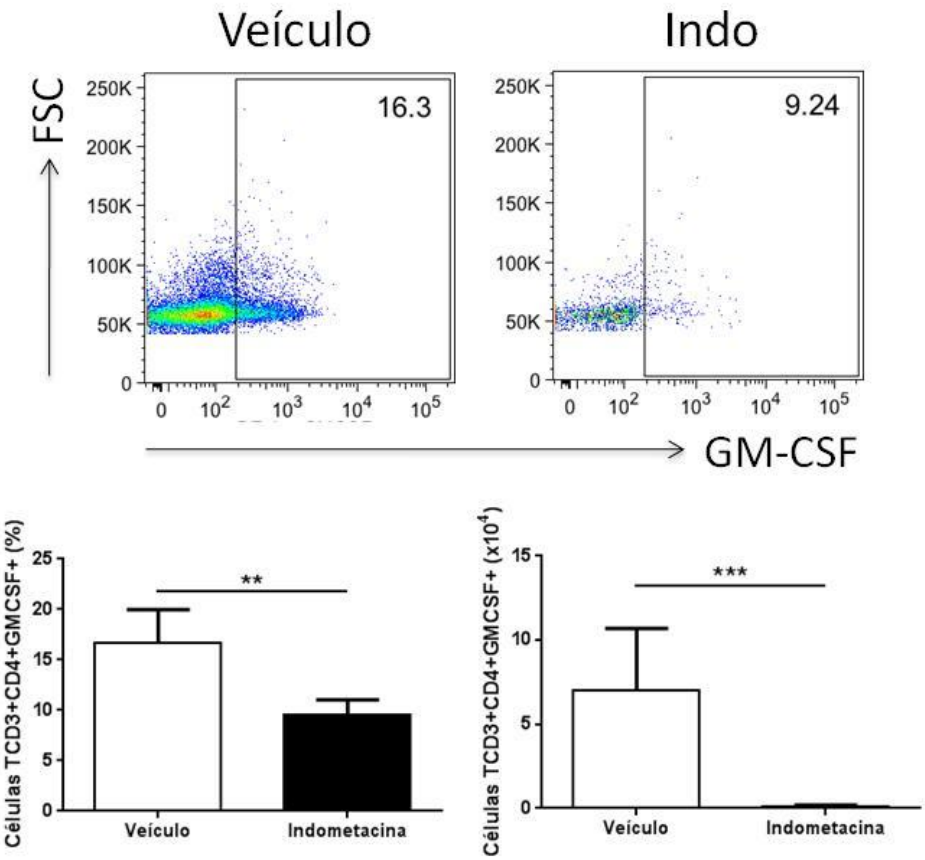


Figura 10: *Indometacina reduz proporção de linfócitos produtores de GMC-CSF no sistema nervoso central.* Células mononucleares foram isoladas do sistema nervoso central (encéfalo e medula espinhal) de camundongos após indução de EAE no dia do pico da doença no grupo controle (~ dia 18) e foram tratados com indometacina ou com o veículo. As células mononucleares foram estimuladas com 50 ng/mL de PMA e 1 µM de ionomicina na presença de brefeldina A (1X) por 4 h em estufa a 37 ˚C e 5% de CO_2. A estratégia dos gates está descrita nos materiais e métodos. O gráfico mostra a porcentagem e o número absoluto de linfócitos TCD4+ produtores de GM-CSF. Os dados representam a média de cinco camundongos de cada grupo ± desvio padrão (SD). Os valores de **p<0,01 e ***p<0,001 foram considerados significativos.

Além da importância das subpopulações Th1 e Th17, sabemos da grande importância das células T reguladoras (Treg) na EAE e do balanço entre essas subpopulações durante o desenvolvimento da doença. Para observar a frequência e o número total de células Treg presentes no veículo e se o tratamento com indometacina foi capaz de alterar esse valor, selecionamos a janela negativa para CD11b e positivo para CD45, o qual é importante para transdução do sinal via complexo TCR nos linfócitos. Entretanto, como CD45 está presente em outras células hematopoiéticas que também não expressam CD11b, realizamos outra janela de células positivas para CD3 e CD4. Uma vez separada a população de linfócitos $TCD4^{+}$, avaliamos a expressão de FOXP3 dentro dessas células (**Figura 11**). Não observamos nenhuma diferença na frequência de células Tregs entre os grupos tratados, o que sugere que a redução da progressão da doença, não foi devido ao aumento da proporção de células Treg controlando as células efetoras no sistema nervoso central. Por outro lado, encontramos diferença entre os grupos quando analisamos o número absoluto de células, diferença que pode ser explicada possivelmente devido ao fato do infiltrado de células totais ter sido maior no grupo controle que no grupo experimental.

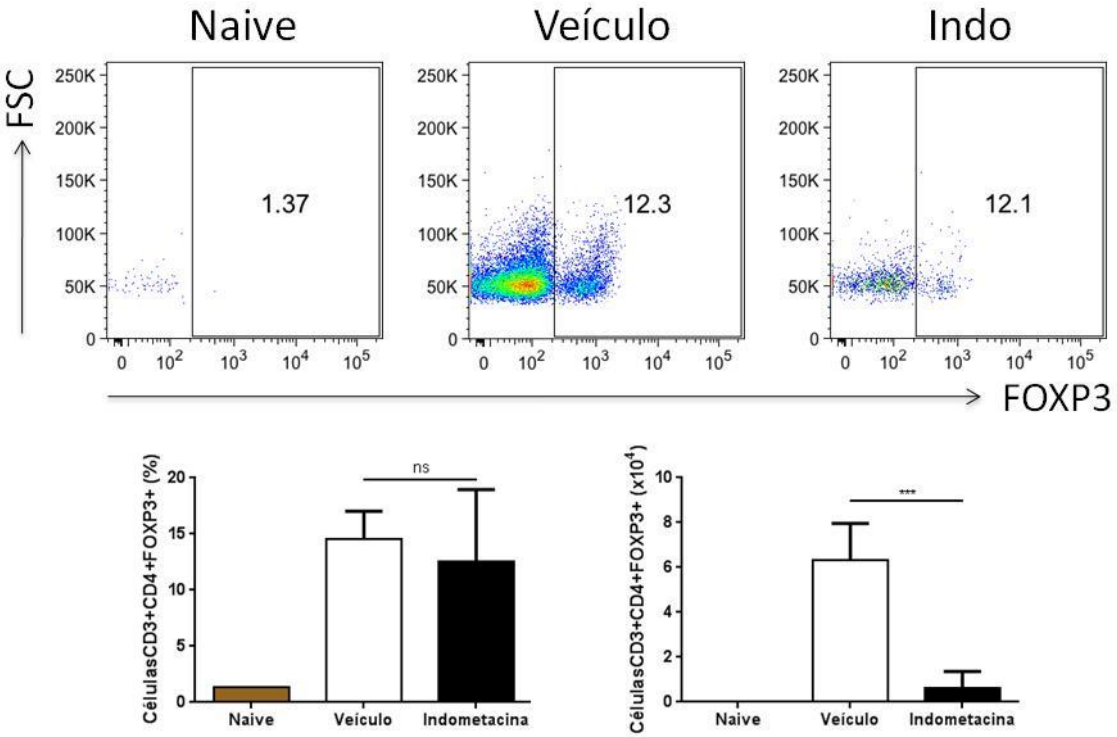


Figura 11: *Indometacina não altera proporção de linfócitos positivos para FOXP3 no sistema nervoso central.* Células mononucleares foram isoladas do sistema nervoso central (encéfalo e medula espinhal) de camundongos após indução de EAE, tratados com indometacina ou com o veículo, no dia do pico da doença no grupo controle (~ dia 18). As células mononucleares foram marcadas para FOXP3 de acordo com especificações do fabricante, vide materiais e métodos. A estratégia dos gates está descrita nos materiais e métodos. O gráfico mostra a porcentagem e o número absoluto de linfócitos TCD4+ positivos para FOXP3. Os dados representam a média de cinco camundongos de cada grupo ± desvio padrão (SD). Os valores de ***p<0,001 foram considerados significativos. ns=não significativo.

Uma vez que não houve diferença na freqüência de células Treg entre os tratamentos, decidimos observar se a proporção entre células efetoras (Th1 e Th17) e células Treg estaria alterada. Através da **Figura 12**, podemos perceber que enquanto há poucas células Treg para as células Th1 e Th17 no grupo controle, no grupo tratado com indometacina, a freqüência dessas três subpopulações se equivale.

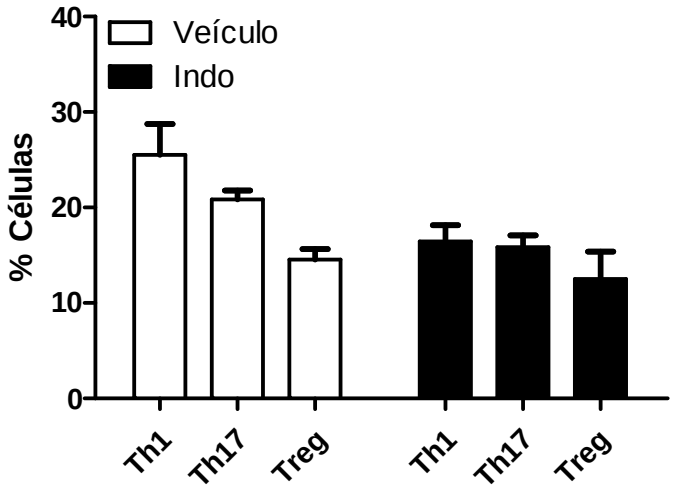


Figura 12: *Indometacina altera proporção entre células T efetoras (Tef) e células T reguladoras (Treg) no sistema nervoso central.* Dentro da janela de linfócitos positivos para CD3 e CD4, foram separados os linfócitos positivos para as citocinas IFN-γ (Th1) e IL-17 (Th17) e para o fator de transcrição FOXP3 (Treg).

Sabemos que os linfócitos TCD4+ não são as únicas células do sistema imune a infiltrar o sistema nervoso central durante a EAE, macrófagos, por exemplo, também são atraídos para o órgão-alvo e contribuem para o desenvolvimento da doença. Para observar se a indometacina é capaz de alterar o perfil de macrófagos e microglias dentro do sistema nervoso central, as células foram processadas da mesma forma que anteriormente, porém em vez de serem incubadas foram imediatamente marcadas com os anticorpos de interesse e analisadas por citometria de fluxo.

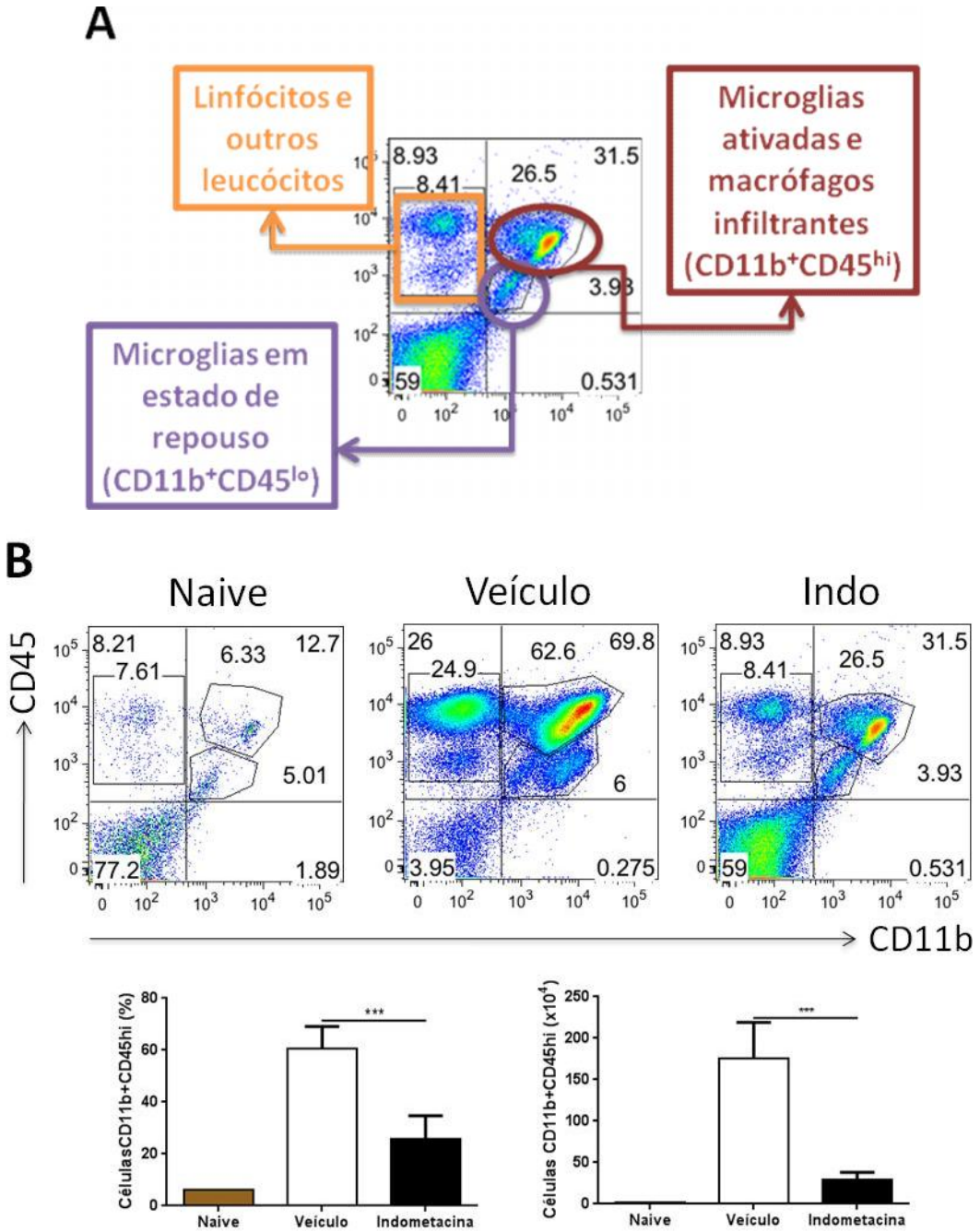


Figura 13. *Indometacina reduz macrófagos infiltrantes e microglias ativadas no sistema nervoso central.* Células mononucleares foram isoladas do sistema nervoso central (encéfalo e medula espinhal) de camundongos naïve e camundongos após indução de EAE tratados com indometacina ou com o veículo no dia do pico da EAE. **A** Desenho esquemático mostrando como é realizada a marcação para linfócitos e outros leucócitos ($CD11b^{-}CD45^{+}$), microglias em repouso ($CD11b^{+}CD45^{lo}$) e para macrófagos infiltrantes e microglias ativadas ($CD11b^{+}CD45^{hi}$) por citometria de fluxo. **B** Os dados representam a média de cinco camundongos de cada grupo (veículo e indometacina) ± desvio padrão (SD). O *naïve* apresenta o valor de apenas um camundongo. Os valores de ***p<0,001 foram considerados significativos. ns=não significativos.

Para entender a análise realizada nesse momento, podemos observar o esquema apresentado na **Figura 13A**, o qual mostra a separação de linfócitos e outros leucócitos ($CD11b^{-}CD45^{+}$), microglias em estado de repouso ($CD11b^{+}CD45^{lo}$) e microglias ativadas e

macrófagos infiltrantes ($CD11b^{+}CD45^{hi}$). Na **Figura 13B** podemos observar que no grupo experimental a frequência de macrófagos e microglias ativadas ($CD11b^{+}CD45^{hi}$) foi menor que no grupo controle, assim como o número absoluto. Quando olhamos para a população de microglias em repouso ($CD11b^{+}CD45^{lo}$), não há alteração na freqüência dessas células, mas o número total de microglias em estado de repouso também é menor no grupo experimental que no grupo controle. No camundongo *naïve*, podemos reparar que há uma quantidade basal tanto de microglias em repouso quanto de microglias e/ou macrófagos ativados, embora essa quantidade seja baixa.

4.3 Efeito da indometacina na proliferação x morte

Caracterizada a doença nos grupos tratados, o próximo passo foi investigar os mecanismos utilizados pela indometacina para reduzir a progressão da doença. O primeiro passo foi avaliar a resposta dos linfócitos, provenientes de linfonodos drenantes, ao estímulo com MOG_{35-55} *ex vivo*, quanto à proliferação e à morte nos dois grupos (controle e experimental). Para esse experimento, 10 camundongos C57BL/6 fêmeas, de aproximadamente 8 semanas, foram imunizados, no coxim plantar, com a emulsão contendo o peptídeo MOG_{35-55}/CFA. Esses camundongos foram divididos em dois grupos de 5 animais cada, sendo que o grupo experimental foi tratado i.p. com 5 mg/kg de indometacina durante os 5 primeiros dias, enquanto o grupo controle recebeu apenas o veículo pelo mesmo período, seguindo a padronização já realizada anteriormente. A diferença desse experimento para os anteriores é que não foi administrada a toxina de *Bordetella pertussis*, uma vez que o objetivo foi recuperar os linfócitos dos linfonodos drenantes antes que estes atravessassem a barreira hematoencefálica e migrassem para o sistema nervoso central.

No quinto dia após indução da EAE, ou seja, no dia seguinte ao término do tratamento, os linfonodos drenantes (inguinais e poplíteos) foram coletados e processados e após contagem em câmara de Neubauer, as células foram marcadas com *cell trace* para avaliação da proliferação e estimuladas ou não com 10 µg do peptídeo de MOG (**Figura 14A e B**) ou 10 µg do peptídeo de OVA (**Figura 14B**) e incubadas em estufa a 37 °C e 5% de CO_2. Neste ensaio, a OVA foi utilizada como peptídeo não-cognato, no intuito de avaliar se a resposta é antígeno-específica, ou seja, se os linfócitos que estão proliferando são os linfócitos específicos para o peptídeo de MOG com o qual os camundongos foram inicialmente imunizados. Após 72 h (3 d), as células foram marcadas com anti-CD3 e anti-CD4 para análise da proliferação apenas dentro da população de linfócitos $TCD4^{+}$.

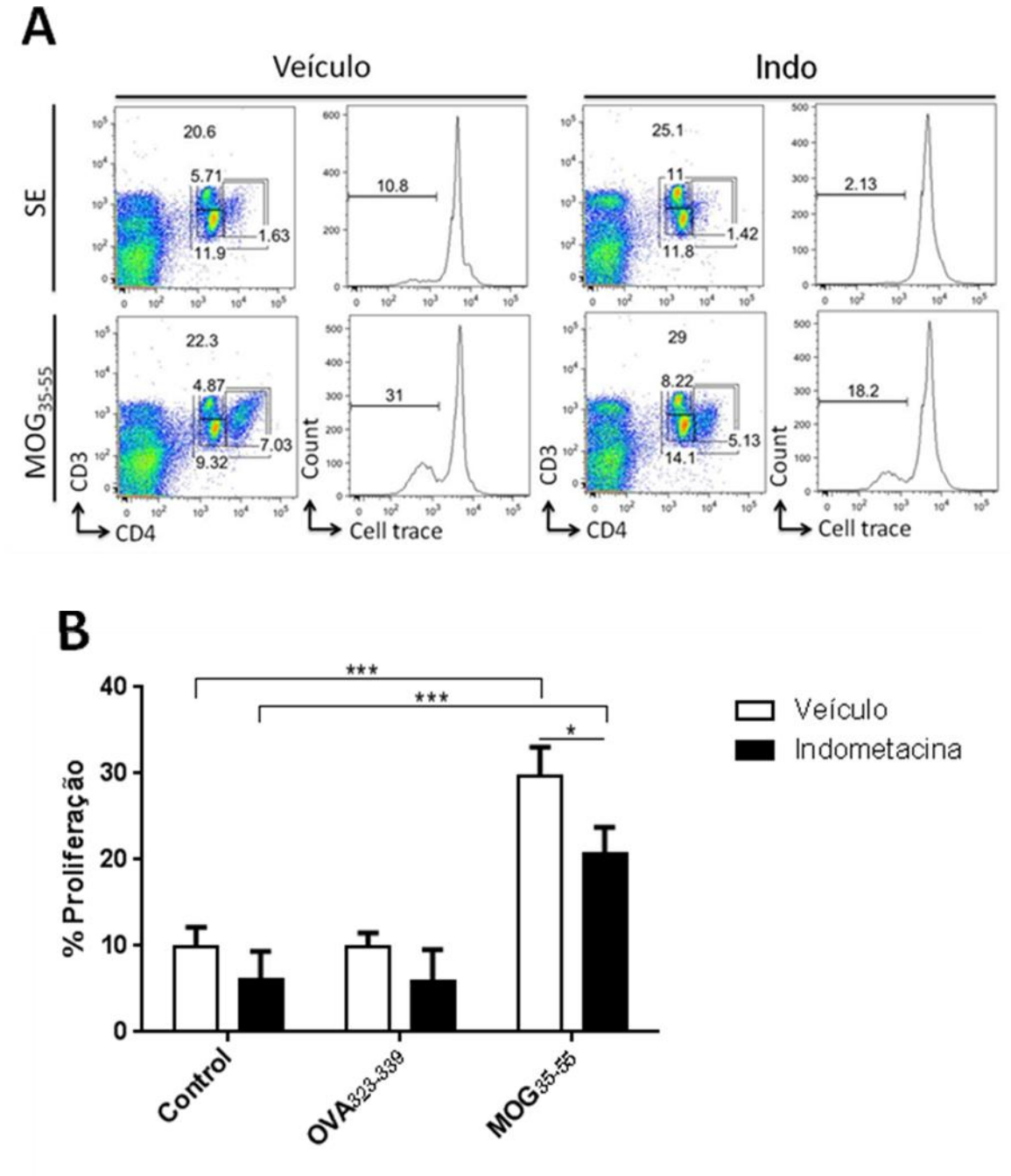
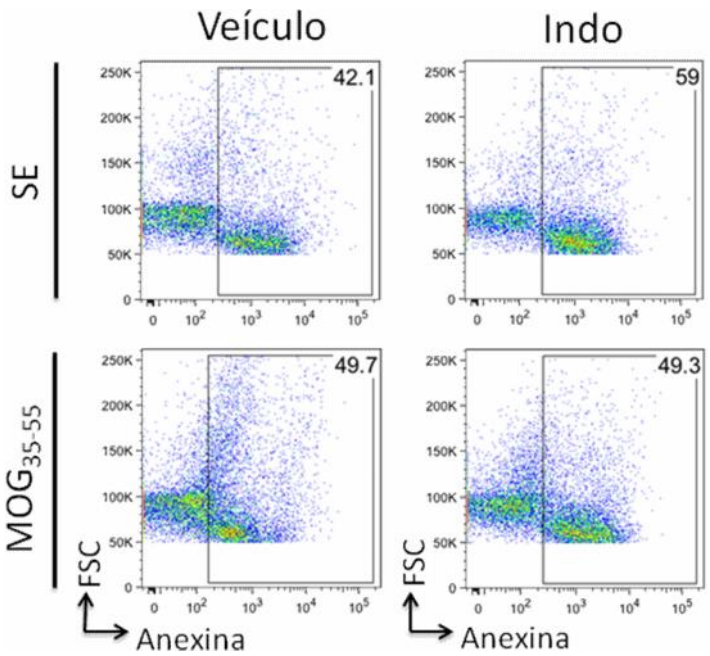


Figura 14. *Tratamento com indometacina reduz taxa de proliferação dos linfócitos TCD4+ nos linfonodos drenantes.* Camundongos C57BL/6 selvagens (WT) foram imunizados s.c. no coxim plantar, com peptídeo MOG_{35-55} homogenizado com CFA, conforme descrito nos materiais e métodos. O grupo experimental foi tratado i.p. com 5 mg/kg de indometacina por cinco dias a partir do dia da imunização. O grupo controle foi administrado i.p. apenas com o veículo (0,4% de etanol em DMEM). As células derivadas do processamento dos linfonodos drenantes (inguinais e poplíteos) foram marcadas com *cell tracer*, estimuladas ou não com paptídeo MOG_{35-55} e após 27 h foram separadas por anti-CD3 e anti-CD4 por citometria de fluxo. A estratégia de *gate* está descrita e detalhada nos materiais e métodos. (**A**) Dentro da janela de linfócitos TCD4+ foram separados $CD3^{lo}CD4^{lo}$, $CD3^{lo}CD4^{hi}$ e $CD4^{lo}CD3^{h}$. A proliferação (*cell tracer*) foi analisada dentro da população duplo positiva para CD3 e CD4. (**B**) Gráfico mostrando a taxa de proliferação. Os dados representam a média das replicatas ± erro padrão da média (n=4 no grupo controle e n=3 no grupo experimental). Os valores de *p<0,05 e ***p<0,001 foram considerados significativos.

Na **Figura 14**, podemos reparar que os linfócitos não-estimulados, de ambos os grupos, apresentaram uma proliferação basal, assim como os linfócitos estimulados com o peptídeo não-correlato de OVA, não havendo diferença entre esses estímulos. Por outro lado, os linfócitos estimulados com o peptídeo MOG_{35-55} apresentaram queda da marcação com *cell tracer*, demonstrando que os linfócitos foram capazes de proliferar em resposta ao estímulo com MOG_{35-55} *ex vivo* e que essa proliferação é antígeno-específica. O grupo tratado com indometacina apresentou menor proliferação quando comparado ao grupo controle. Entretanto, quando comparamos os estímulos dentro do mesmo grupo, podemos reparar que linfócitos derivados do grupo tratado com o veículo apresentaram uma proliferação basal de aproximadamente 10% e uma proliferação de cerca de 30% quando estimulados com MOG (aumento de 3X). Já dentro do grupo da indometacina, a proliferação basal dos linfócitos foi de aproximadamente 5% aumentando para cerca de 20% quando estimulados com o peptídeo específico, ou seja, quatro vezes mais. É interessante observar também que ao analisarmos o *density plot* da **Figura 14A**, o qual mostra as células positivas para CD3 e CD4, percebemos que os linfócitos dos grupos que proliferaram aumentaram a expressão para CD4.

Quando analisamos a taxa de morte na **Figura 15** das células marcadas com *cell tracer* através da marcação com anexina V, não encontramos nenhuma diferença, seja em relação aos estímulos utilizados (MOG, OVA) ou entre os grupos tratados, a taxa de anexina V foi de aproximadamente 55% em todos. Vale lembrar que a porcentagem de anexina V é um dos métodos utilizados para detecção de apoptose, uma vez que a anexina V possui alta afinidade pela fosfatidilserina, fosfolipídeo normalmente localizado na face interna da membrana plasmática e exposto na membrana durante o processo de apoptose.



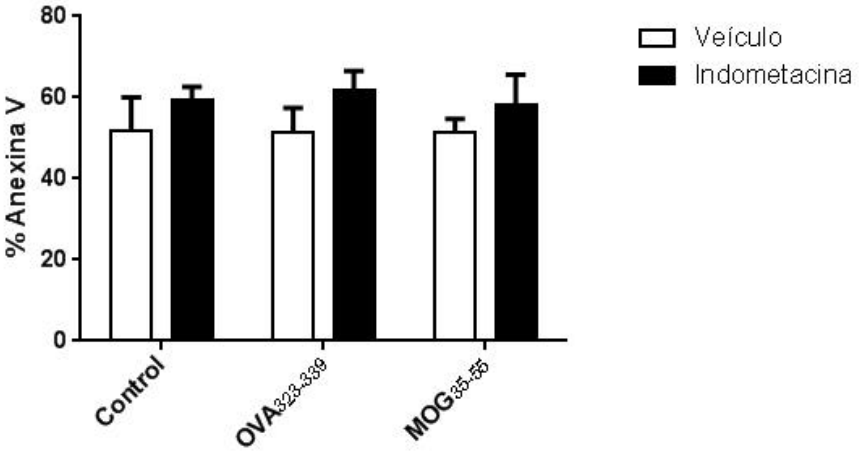
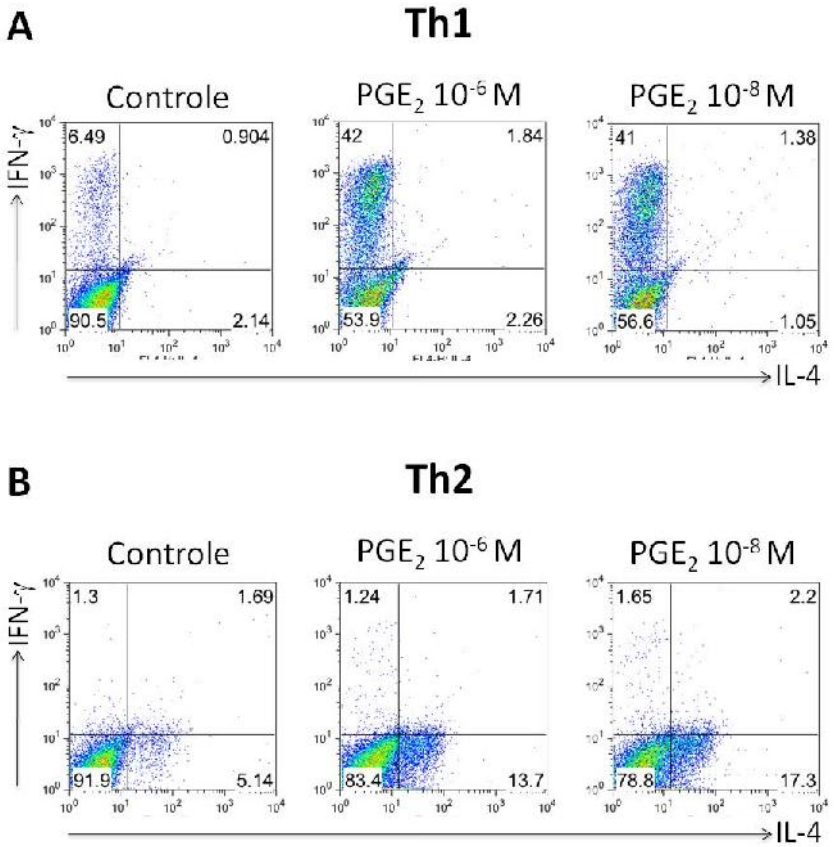


Figura 15. *Indometacina não altera taxa de apoptose dos linfócitos presentes nos linfonodos drenantes.* Camundongos C57BL/6 selvagens (WT) foram imunizados s.c. no coxim plantar, com peptídeo MOG_{35-55} homogenizado com CFA, conforme descrito nos materiais e métodos. O grupo experimental foi tratado i.p. com 5 mg/kg de indometacina por cinco dias a partir do dia da imunização. O grupo controle foi administrado i.p. apenas com o veículo (0,4% de etanol em DMEM). As células derivadas do processamento dos linfonodos drenantes (inguinais e poplíteos) foram marcadas com *cell tracer*, estimuladas ou não com paptídeo MOG_{35-55} e após 72 h foram separadas por anti-CD3 e anti-CD4 por citometria de fluxo. A estratégia de gate está descrita e detalhada nos materiais e métodos. Dentro da janela de linfócitos TCD4+ foram separados $CD3^{lo}CD4^{lo}$, $CD3^{lo}CD4^{hi}$ e $CD4^{lo}CD3^{hi}$. A taxa de apoptose foi analisada dentro da população duplo positiva para CD3 e CD4 através da marcação com anexina V (**B**) Gráfico mostrando a taxa de proliferação. Os dados representam a média das replicatas ± erro padrão da média (n=4 no grupo controle e n=3 no grupo experimental). Os valores de *p<0,05 e ***p<0,001 foram considerados significativos.

4.4 Indometacina altera geração de linfócitos efetores

Além do papel da PGE_2 na modulação da sobrevivência (proliferação x morte celular) de linfócitos, alguns trabalhos na literatura abordam seu papel na diferenciação de subpopulações de linfócitos $TCD4^+$ e, consequentemente, na geração das respostas. Para saber se a PGE_2 participa diretamente do processo de diferenciação dessas subpopulações, realizamos a diferenciação *in vitro* desses linfócitos na presença de PGE_2 a 10^{-6} e 10^{-8} M. Para a diferenciação, linfonodos periféricos foram coletados de camundongos C57BL/6 *naives* e as células $CD4^+$ foram purificadas por seleção negativa, conforme detalhado nos materiais e métodos. Após seleção, essas células foram separadas em diferentes condições e aos poços foram adicionados anticorpos anti-CD3 e anti-CD28 para ativação, além de citocinas recombinantes e anticorpos neutralizantes indicados para cada condição na presença de 10^{-6} e 10^{-8} M de PGE_2. As placas foram mantidas em estufa a 37 ºC e 5% de CO_2. Após 6 d, a porcentagem de diferenciação obtida em cada condição e o efeito da PGE_2 sobre elas foram analisados por citometria de fluxo.



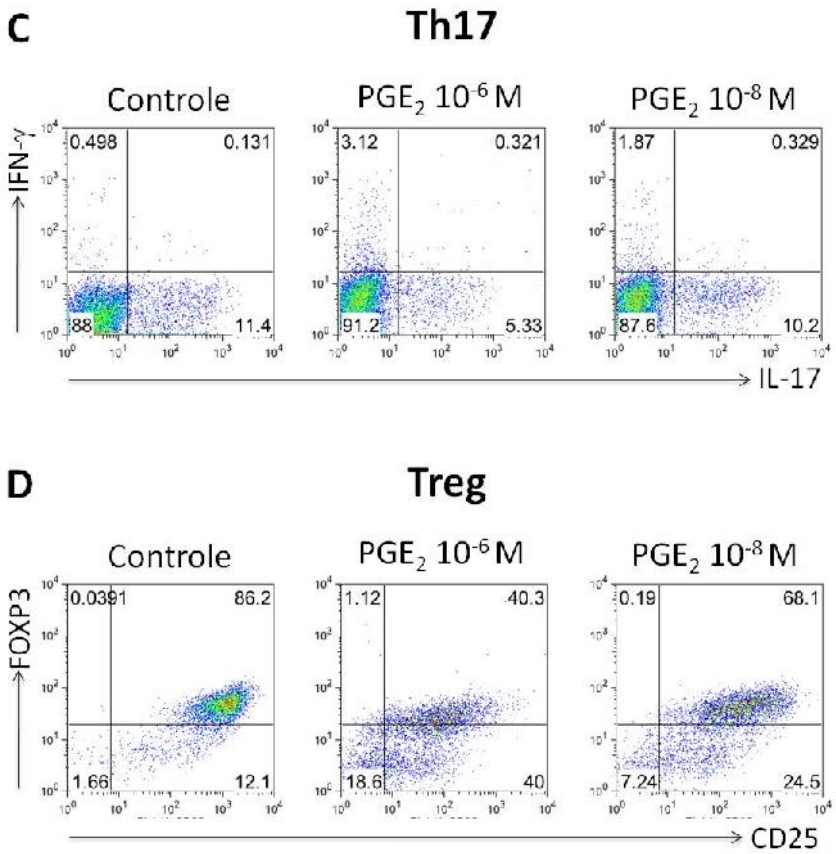


Figura 16. *Efeito da PGE_2 no processo de diferenciação das subpopulações de linfócitos $TCD4^+$ Th1, Th2, Th17 e Treg.* A partir de células de linfonodos periféricos (cervicais, braquiais, axilares e inguinais) de camundongos C57Bl/6 naives, células foram separadas para $CD4^+$ por seleção negativa. No primeiro dia, juntamente com o estímulo de anti-CD3 3 anti-CD28 para ativação das células, estas foram tratadas com duas concentrações de PGE_2 (10^{-6} e 10^{-8} M) e depois foram mantidas e cultura por dias com IFN-γ + anti-IL4 (para Th1), IL-4 + anti-IFN-γ (Th2), IL-17 + anti-IFN-γ (Th17) e TGF-β mais Il-6 (Th17). Após x dias de cultura, a porcentagem de diferenciação de cada subtipo celular foi confirmado por citometria de fluxo com os anticorpos: anti-IFN-γ e anti-IL4 (Th1 e Th2), anti-IL-17 e anti-IFN-γ (Th17).

Através dos gráficos da **Figura 16**, podemos observar que foi possível obter uma diferenciação de aproximadamente 6,5% para Th1, 5% para Th2, 11% para Th17 e 86% para Treg, confirmados pela marcação com os anticorpos capazes de reconhecer as citocinas de assinatura de Th1 (IFN-γ), Th2 (IL-4) e Th17 (IL-17) e pela dupla-marcação do fator de transcrição-chave de Treg (FOXP3) e da molécula de superfície constitutivamente presente nessas células (CD25). Apesar da porcentagem de diferenciação ter sido menor que 50% para quase todas as subpopulações, exceto para Treg, em nenhuma das culturas parece haver contaminação com os principais subtipos celulares comparados. As células que não se diferenciaram, à princípio, parecem ter se mantido em estado de repouso.

Se de fato a PGE_2 participa da diferenciação das subpopulações de linfócitos $TCD4^+$ *in vitro* é possível que ela seja uma das responsáveis pela geração das respostas *in vivo* durante a

EAE e que a ausência dela induzida pelo tratamento com indometacina resulte na alteração dessas respostas. Para investigar essa possibilidade, analisamos as células produtoras de IFN-γ e IL-17 nos linfonodos dos camundongos submetidos à EAE e tratados com indometacina. Para isso, 14 camundongos C57BL/6J fêmeas, de aproximadamente 8 semanas, foram imunizados, no coxim plantar, com emulsão contendo o peptídeo MOG_{35-55} mais CFA. Esses camundongos foram divididos em dois grupos de 7 animais cada, sendo que o grupo experimental foi tratado i.p. com 5 mg/kg de indometacina durante os 5 primeiros dias, enquanto o grupo controle recebeu apenas o veículo pelo mesmo período, seguindo a padronização já realizada anteriormente. Para esse experimento, não foi administrada a toxina de *Bordetella pertussis*, uma vez que o objetivo mais uma vez foi recuperar os linfócitos dos linfonodos drenantes antes que estes migrassem para o sistema nervoso central.

No quinto dia após indução da EAE, os linfonodos drenantes (inguinais e poplíteos) foram coletados e processados e após contagem em câmara de Neubauer, $3x10^5$ células foram estimuladas ou não com 10 µg ou 100 µg de MOG_{35-55} e incubadas em estufa a 37 °C e 5% de CO_2 em placas previamente sensibilizadas com os anticorpos anti-IFN-γ (**Figura 17**) e anti-IL-17 (**Figura 18**) para a realização da técnica de ELISPOT, descrita nos matérias e métodos.

Através da **Figura 17**, podemos perceber que há uma freqüência basal de células produtoras de IFN-γ, mesmo quando as células não são re-estimuladas. Essa freqüência aumenta quando as células são estimuladas com o peptídeo de MOG, mas não há diferença entre o estímulo com 10 µg e 100 µg. Além disso, apesar de há uma tendência dessa frequência diminuir nas células do grupo que foi previamente tratado com indometacina, essa diferença não é estatisticamente significativa.

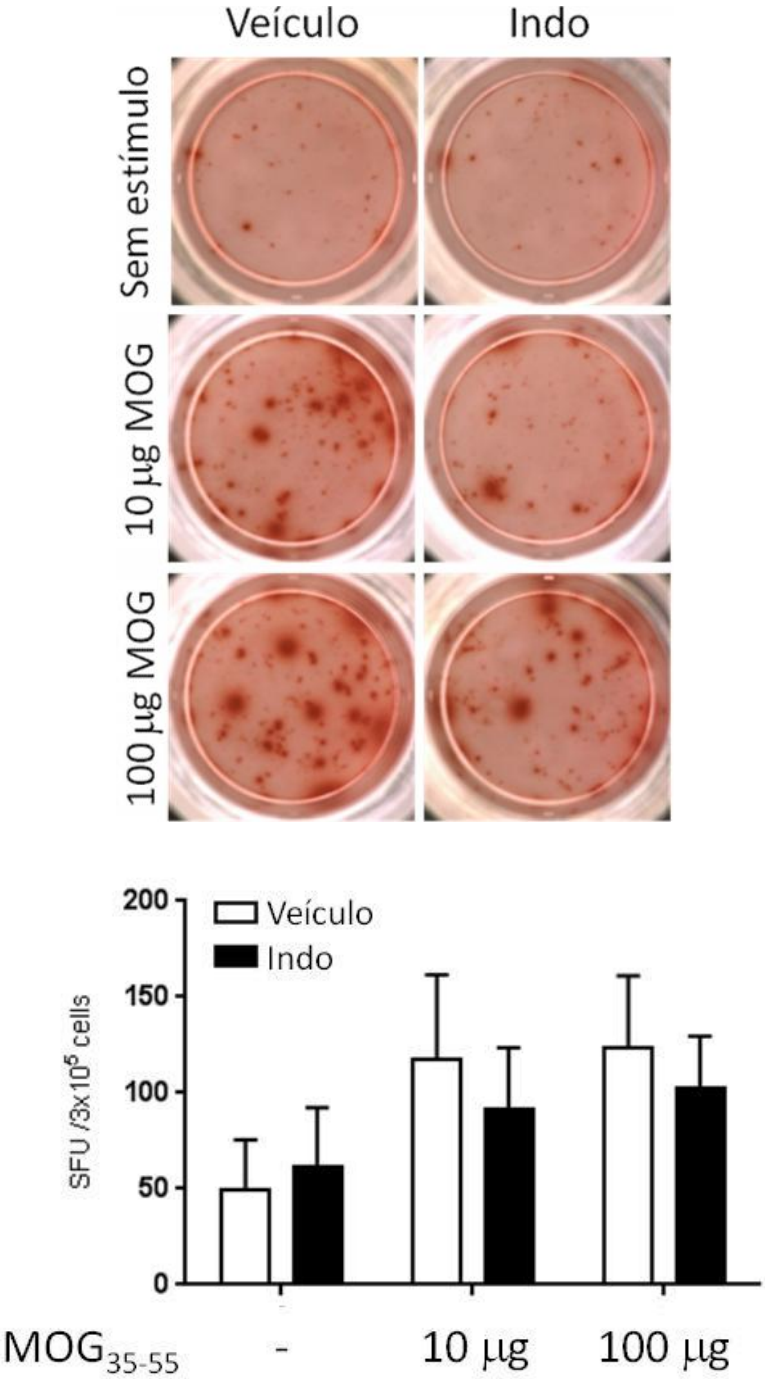


Figura 17. Indometacina não altera frequência de células produtoras de IFN-γ na EAE. Camundongos C57BL/6 selvagens (WT) foram imunizados s.c. no coxim plantar, com peptídeo MOG_{35-55}/CFA, conforme descrito nos materiais e métodos. O grupo experimental (barra preta) foi tratado i.p. com 5 mg/kg de indometacina por cinco dias a partir do dia da imunização. O grupo controle (barra branca) foi administrado i.p. apenas com o veículo (0,4% de etanol em DMEM). No quinto dia após a imunização, a frequência de células produtoras foi determinada *ex vivo* na presença ou não de 10 µg/mL e 100 µg/mL de peptídeo MOG_{35-55} através da técnica de ELISPOT, descrita nos materiais e métodos. Os dados representam a média das replicatas ± erro padrão da média (n=7).

Por outro lado, ao analisarmos a **Figura 18**, percebemos que não há praticamente nenhuma freqüência basal de células produtoras de IL-17 em nenhum dos grupos. Após

estímulo com peptídeo de MOG podemos quantificar a freqüência de células produtoras dessa citocina, tanto no grupo previamente tratado com o veículo ou com indometacina. E podemos reparar também que essa freqüência foi menor no grupo experimental, efeito visualmente perceptível e estatisticamente significativo.

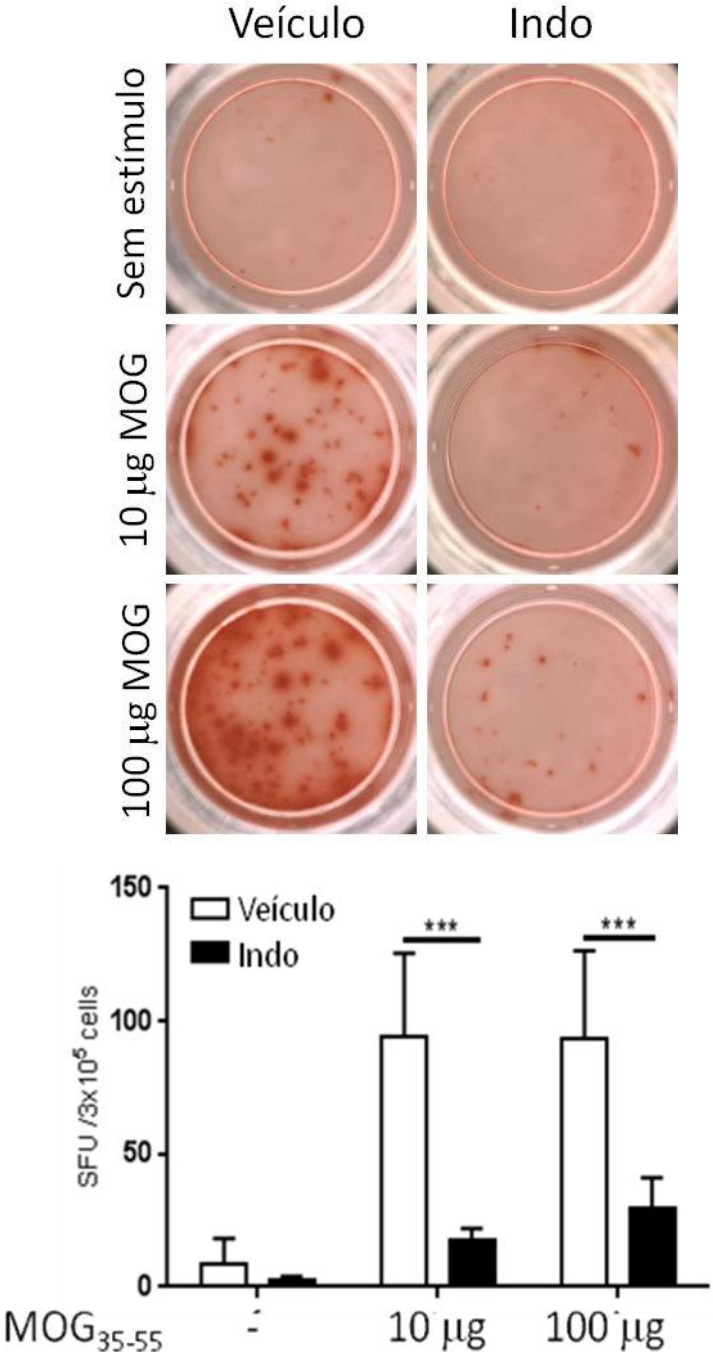


Figura 18. Indometacina altera a frequência de células produtoras de IL-17 na EAE. Camundongos C57BL/6 selvagens (WT) foram imunizados s.c. no coxim plantar, com peptídeo MOG_{35-55} misturado em CFA, conforme descrito nos materiais e métodos. A indo (barra preta) foi tratado i.p. com 5 mg/kg de indometacina por cinco dias a partir do dia da imunização. O controle (barra branca) foi administrado i.p. apenas com o veículo (0,4% de etanol em DMEM). No quinto dia após a imunização, a frequência de células produtoras foi determinada *ex vivo* na presença ou não de 10 µg/mL e 100 µg/mL de peptídeo MOG_{35-55} através da técnica de ELISPOT, descrita nos materiais e métodos. Os dados representam a média das replicatas ± erro padrão da média (n=7).

Visto que o tratamento com indometacina parece alterar a frequência de células produtoras de IL-17 e apresentou uma tendência a reduzir a frequência de células produtoras de IFN-γ, nos perguntamos como estaria a secreção dessas citocinas no sobrenadante. Para isso, células do experimento anterior foram separadas e incubadas com ou sem 10 e 100 µg do peptídeo de MOG em estufa a 37 °C e 5% de CO_2 por 48 h. Após esse período, o sobrenadante foi utilizado para quantificação de IFN-γ, IL-17, IL-2 e IL-10 pela técnica de ELISA.

Na **Figura 19**, Podemos observar que a produção de IFN-γ e de IL-17 nas células que não foram estimuladas é quase que imperceptível. Quando as células foram estimuladas *ex vivo* com o peptídeo MOG_{35-55} houve um aumento estatisticamente considerável de ambas as citocinas e esse aumento foi concentração-dependente. Quando analisamos as diferenças entre os grupos previamente tratados com o veículo e indometacina, a diferença é muito significativa. No caso da IL-17, por exemplo, indo de acordo com o resultado do ELISPOT, a produção dessa citocina no estímulo com 10 µg nas células derivadas dos linfonodos de camundongos tratados com indometacina é praticamente equivalente a produção basal nas células sem estímulo e embora pareça haver um aumento quando a concentração é 10 vezes maior, esse aumento não estatisticamente significativo (**Figura 17B**).

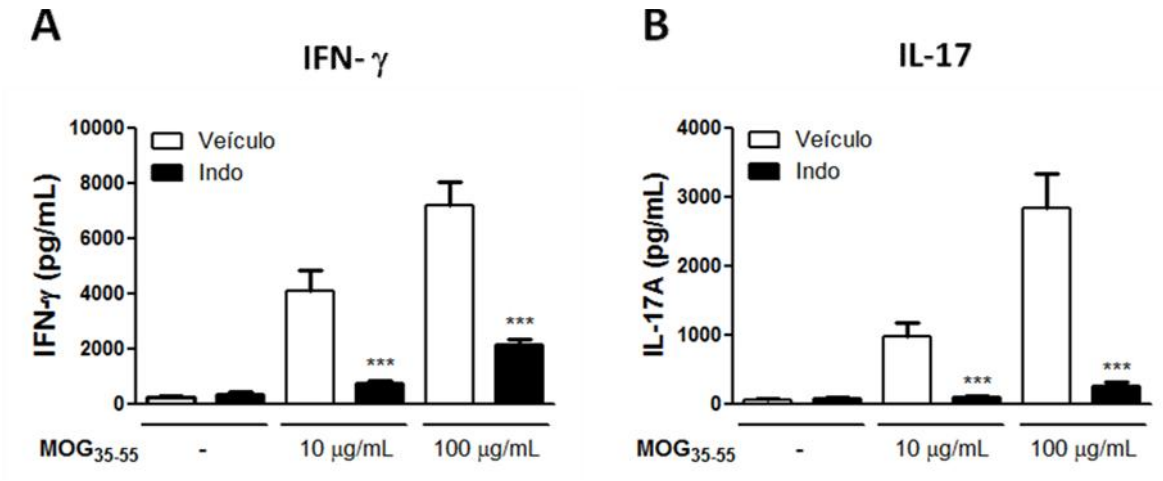


Figura 19. *Efeito do tratamento com indometacina na produção de IFN-¥ e IL-17.* Camundongos C57BL/6 selvagens (WT) foram imunizados s.c. no coxim plantar, com peptídeo MOG_{35-55} misturado em CFA, conforme descrito nos materiais e métodos. O grupo experimental (barra preta) foi tratado i.p. com 5 mg/kg de indometacina por cinco dias a partir do dia da imunização. O grupo controle (barra branca) foi administrado i.p. apenas com o veículo (0,4% de etanol em DMEM). As células dos linfonodos drenantes (inguinais e poplíteos) foram estimuladas, *ex vivo*, com ou sem 10 µg/mL e 100 µg/mL de peptídeo MOG_{35-55}. As citocinas IFN-γ e IL-17 foram dosadas pelo método de ELISA. Os dados representam a média das replicatas ± erro padrão da média (n=5). Os valores de ***p<0,001 foram considerados significativos.

5 DISCUSSÃO

O estudo da modulação da sobrevivência de linfócitos $TCD4^+$ é de suma importância visto que essas células são centrais na imunidade adaptativa e o aumento ou diminuição da proliferação ou da morte está relacionado a muitas patologias. Resultados previamente publicados pelo nosso grupo demonstraram que era possível fazer essa modulação através da PGE_2 sob determinadas condições *in vitro*. Assim, quando linfócitos $TCD4^+$ eram submetidos a indução de AICD na presença de PGE_2, tornavam-se protegidos desse processo de morte celular. A importância dessa modulação *in vivo* ainda não é conhecida, mas pode estar na capacidade das APCs de adiar a morte de linfócitos T ativados durante as respostas imunes até que haja a eliminação completa do antígeno. Por outro lado, este mesmo processo pode favorecer a sobrevivência de linfócitos autorreativos ativados por antígenos próprios e levar ao desenvolvimento de doenças autoimunes. O protótipo de doenças autoimunes mediada por linfócitos T é a EAE, o modelo murino da Esclerose Múltipla, considerada um dos melhores modelos para se estudar a resposta imune/inflamatória.

Na fase de indução da EAE - primeiros dias após a imunização - ocorre tanto o englobamento do antígeno (peptídeo MOG_{35-55}) quanto o reconhecimento do adjuvante (CFA) pelas APCs que amadurecem e se tornam aptas a apresentar este peptídeo via MHC de classe II para reconhecimento por linfócitos TCD4 específicos, momento em que haverá ativação, diferenciação e proliferação dos clones autorreativos. Como um terceiro sinal durante a apresentação de antígenos, acreditamos que as APCs estejam secretando PGE_2, fruto de um processo interno de metabolização do ácido araquidônico presente na membrana dessas células, que será reconhecida pelos linfócitos T através dos receptores EP2 e EP4. Esse reconhecimento vai ativar uma via de sinalização intracelular que termina com a repressão do FASL por estas células e permite a expansão das mesmas. Para começar a investigar essa história, optamos pelo tratamento com indometacina, uma droga da classe dos anti-inflamatórios não-esteroidais não-seletivos, ou seja, capaz de bloquear tanto COX-1 quanto COX-2, resultando no bloqueio da produção de PGE_2 total.

Nos primeiros momentos após indução da doença, é possível que a PGE_2 importante para indução da doença seja gerada a partir da metabolização do ácido araquidônico pela COX-1, que é constitutiva. Isso é suportado por dados da literatura de que COX-1 também está aumentada em macrófagos e microglias durante a EAE. Outra possibilidade é que COX-1 aja em sinergismo com COX-2 durante a indução de processos inflamatórios. Se essa

premissa for verdadeira, na ausência de apenas uma dessas enzimas pode haver um mecanismo compensatório pela outra. Outros dados que dão suporte a isso é que ratos transgênicos, deficientes do gene COX-1, não desenvolvem úlceras espontaneamente, mas a inibição seletiva de COX-2 resulta em pequenas úlceras no intestino delgado, provavelmente porque na ausência de COX-1 haja um aumento compensatório da COX-2. Esse mesmo mecanismo compensatório pode ocorrer também em camundongos nocautes para COX-2 que desenvolvem EAE com severidade semelhante a camundongos selvagens (71, 72, 73).

Com base nessas evidências, é prudente pensar que se utilizássemos em nosso modelo um inibidor seletivo de COX-2, a COX-1 poderia compensar a ausência de COX-2 produzindo PGE_2 em resposta aos estímulos inflamatórios. Por isso optamos por utilizar uma droga não-seletiva e ter a certeza de que com ambas as isoformas bloqueadas, a PGE_2 não seria produzida no momento de indução da doença. Ainda com base na literatura, utilizamos a concentração de 5 mg/kg, descrita como capaz de bloquear a produção central de PGE_2 sem causar toxicidade. Como acreditamos que a PGE_2 e talvez demais prostaglandinas sejam importantes durante a fase de ativação, diferenciação e proliferação dos linfócitos na periferia e sabemos que esse período é de 1 a 7 dias na EAE, optamos por realizar o tratamento nos cinco primeiros dias, ou seja, na fase de indução da doença. Nossos resultados demonstraram que o tratamento com indometacina somente por este período foi responsável pela redução da incidência e progressão da doença por todo o curso da mesma de forma estatisticamente significativa.

Os dados obtidos até aqui corroboram com dados encontrados na literatura, de que o tratamento com indometacina é capaz de reduzir a progressão da doença (63, 74, 75). Em um destes trabalhos, pertencente ao grupo do Takashi Yamamura, foi realizada a indução de EAE e o tratamento com diferentes drogas inibidoras de COX. Entretanto, o tratamento com indometacina neste trabalho foi realizado diariamente, diferente do que fizemos. O tratamento diário com uma droga anti-inflamatória leva ao bloqueio constante do processo inflamatório, o que provavelmente tenha levado a uma menor progressão da doença. O efeito colateral deste tratamento foi que todos os camundongos morreram de hemorragia gastrointestinal dentro de 30 dias. Isso provavelmente ocorreu porque um dos eventos fisiológicos pelo qual a PGE_2 é responsável é a regulação do muco gástrico, e o bloqueio da PGE_2 de forma crônica possivelmente resultou na desregulação do suco gástrico com consequente hemorragia. Como todos os camundongos morreram, o tratamento com essa droga não foi considerado relevante e o mecanismo de ação não foi investigado (75). No nosso modelo, como a indometacina foi utilizada por apenas cinco dias, esta foi capaz de reduzir a progressão da doença sem levar os

camundongos a óbito, mesmo após meses de observação (dados não mostrados). Além disso, é coerente pensar que seu efeito nesses primeiros dias não seja apenas anti-inflamatório, uma vez que ele perdurou mesmo após o término do tratamento.

De toda forma, para confirmar que o efeito da indometacina não seja apenas na inflamação, que se instala na fase efetora da doença, e que o tratamento é importante na fase de indução da EAE, realizamos o tratamento dos camundongos também na fase efetora, ou seja, após o início dos sinais clínicos e próximo ao pico da doença. Quando o tratamento foi realizado nessa fase, a indometacina foi capaz apenas de atrasar levemente o grau do escore clínico da EAE, não apresentando efeito significativo sobre a doença e demonstrando que no nosso modelo o efeito da indometacina vai além do seu potencial anti-inflamatório e seu efeito protetor só ocorre quando utilizada na fase de indução da doença.

Uma vez demonstrado que o tratamento com indometacina foi capaz de reduzir a progressão da EAE, o próximo passo foi observar e caracterizar a doença nos grupos tratados com o veículo e com a indometacina. Diferente do que ocorre na Esclerose Múltipla, na EAE o infiltrado celular atinge mais a medula espinhal do que o cérebro (76), embora este também seja atingido. Para saber se havia uma diferença de infiltrado celular no sistema nervoso central de camundongos tratados, observamos separadamente encéfalo e medula espinhal por análise histológica. Tanto o encéfalo quando a medula espinhal de camundongos tratados com o veículo apresentam um maior infiltrado celular, que está reduzido no grupo tratado com indometacina, conforme esperado. Neste modelo crônico de EAE a patologia observada na polpa branca apresenta muito menos desmielinização que no modelo induzido no rato Lewis, por exemplo. Sendo assim, este modelo não é o melhor para estudo do processo e visualização da desmielinização e, por isso, embora tenhamos tentado observar a desmielinização no sistema nervoso central pela coloração com *luxol fast blue*, isso não foi possível (dados não mostrados).

Após demonstração de que a indometacina foi capaz de reduzir o infiltrado celular, o próximo passo foi a identificação desse infiltrado quantitativa e qualitativamente. Sabemos que, enquanto na Esclerose Múltipla a doença é mediada principalmente por linfócitos $TCD8^+$, na EAE a resposta é desencadeada predominantemente por linfócitos $TCD4^+$. Estes linfócitos se ativam, diferenciam e proliferam na periferia e migram, juntamente com outras células do sistema imune, para o sistema nervoso central onde causam inflamação resultando na desmielinização e perda axonal com consequentes sinais neurológicos. Através de imunofenotipagem por citometria de fluxo, foi possível observar que há um menor infiltrado celular no grupo tratado com indometacina e um menor infiltrado específico de linfócitos

$TCD4^+$, identificados pela dupla marcação com anti-CD3 e anti-CD4. Estes resultados que demonstram ma menor quantidade de células inflamatórias vão de acordo com as observações de redução dos sinas clínicos nos animais tratados com indometacina.

Inicialmente, acreditava-se que a subpopulação efetora dos linfócitos T na EAE fosse a Th1. Isso porque camundongos deficientes da subunidade p40, uma das subunidades da IL-12, responsável pela diferenciação para Th1, eram resistentes a indução de EAE. Além disso, o tratamento com IFN-γ exacerbava a doença. Posteriormente, foi descoberto que a subunidade p40 era compartilhada pela IL-23, citocina responsável pela manutenção de Th17. Para avaliar separadamente, então, a importância de IL-12 e IL-23 no desenvolvimento da EAE foi realizado o bloqueio das subunidades específicas dessas citocinas, o qual mostrou que a ausência de p19, exclusiva da IL-23, e não de p35, exclusiva da IL-12, é que tornava os camundongos resistentes a EAE (77). Assim, embora Th17 pareça ser ainda mais importante que Th1 na indução da EAE, as duas subpopulações participam do desenvolvimento da doença (78). Nos nossos resultados pudemos perceber que há infiltrado de linfócitos produtores de IFN-γ e IL-17, as citocinas de assinatura de Th1 e Th17, respectivamente, como era esperado e que esse infiltrado é menor no grupo tratado com indometacina, sugerindo que há um grupo menor de linfócitos T efetores infiltrados no SNC. É interessante analisar não somente essas citocinas isoladamente, mas em conjunto, pois a plasticidade, ou seja, a capacidade da mesma célula produzir ambas as citocinas têm sido cada vez mais discutida na literatura (68). Entretanto, nos nossos resultados não observamos nenhuma alteração na frequência de células produtoras de ambas as citocinas. As células Th17, por exemplo, expressam um marcador único que é o receptor IL-1R1 foi demonstrado que essas células positivas para esse receptor que inicialmente secretam IL-17, começaram secretar IFN-γ e GM-CSF (68).

Mais recentemente, outra citocina foi descrita como tendo um papel fundamental no desenvolvimento da EAE, o GM-CSF (79), um fator de crescimento para granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e monócitos, secretado por muitas células do sistema imune (79, 80). Durante a EAE, a secreção de GM-CSF por linfócitos T encefalitogênicos (81) é importante, por exemplo, para ativação das microglias, necessárias para indução da EAE (70, 80, 82). As evidências da importância dessa citocina surgiram de camundongos deficientes de GM-CSF resistentes a indução de EAE. Nossos resultados mais uma vez vão de acordo com a literatura demonstrando que células produtoras dessa citocina estão infiltradas no SNC de camundongos após indução da EAE e que a redução da

progressão da doença está associada a uma redução das células produtoras dessa citocina também.

Além dos linfócitos efetores, Th1 e Th17, sabemos que células supressoras Treg também infiltram o SNC e que o balanço entre essas subpopulações caracteriza a fase em que se encontra a doença. No começo dos sinais clínicos, há muito mais células efetoras no sistema nervoso central que Treg, fato também visto por nós neste trabalho (10). Porém, à medida que os camundongos vão entrando na fase de remissão essa proporção vai se modificando e a frequência das células efetoras vai diminuindo, enquanto das células reguladoras vai aumentando (83, 84). Embora tenhamos realizado essa análise somente no dia do pico, o que podemos perceber é que a indometacina foi capaz de alterar somente o número absoluto, mas não a frequência de células reguladoras, provavelmente devido ao menor infiltrado celular no sistema nervoso central de forma geral. Entretanto, como o tratamento com indometacina levou a redução das populações efetoras, houve uma alteração na proporção entre essas duas subpopulações de células T efetoras e T reguladoras, o que poderia resultar em um maior controle da doença e por isso menor progressão da mesma.

Além dos linfócitos T, monócitos também infiltram o sistema nervoso central e contribuem para o desenvolvimento da doença. Uma vez no órgão-alvo, juntamente com as microglias, os macrófagos serão responsáveis pela apresentação de antígenos aos linfócitos já ativados. A grande limitação na identificação dos macrófagos infiltrantes no SNC é que eles apresentam os mesmos marcadores que as microglias ativadas (85). Embora alvo de muitas críticas e discussões na literatura, uma das formas ainda mais utilizadas para fazer uma separação parcial dessas células é a dupla marcação com CD45 e CD11b. Ambos, macrófagos e microglias, apresentam CD11b em sua superfície. O CD45 é uma proteína tirosina-fosfatase associada a receptor, que funciona como marcador de células hematopoiéticas e que está expresso em alta quantidade nos macrófagos ($CD45^{hi}$). Em contraste com neurônios, astrócitos e oligodendrócitos, as microglias originam-se da hematopoese primitiva que ocorre no saco vitelino e migram pelo tubo neuronal durante a embriogênese (86). Dessa forma, as microglias também expressam CD45 em estado de repouso, porém em baixa quantidade ($CD45^{lo}$). Entretanto, durante a EAE, por exemplo, as microglias se ativam, mudam de conformação e aumentam a expressão de marcadores de superfície, como F4/80, Mac-1, CD11b e CD45, dificultando a diferenciação destas com os macrófagos infiltrantes (87, 88). Com base nessa marcação, observamos que a indometacina também foi capaz de reduzir a população de macrófagos infiltrantes e microglias ativadas, indo de acordo com a menor progressão da doença. As microglias respondem a danos neuronais e são responsáveis pela

remoção de células danificadas por fagocitose, tal qual os macrófagos na periferia e são consideradas marcadores de patologia cerebral. Por outro lado, a ativação crônica das microglias pode causar dano neuronal pela liberação de moléculas potencialmente citotóxicas como citocinas pró-inflamatórias, intermediários reativos do oxigênio, proteinases e proteínas do sistema complemento. Além disso, as microglias também sofrem aumento da expressão de MHC classe II, podendo atuar, da mesma maneira que os macrófagos infiltrantes, como células apresentadoras de antígenos, apresentando antígenos aos linfócitos T encefalitogênicos no local da inflamação e reativando essas células, o que auxilia a amplificação do sinal pelo mecanismo de *epitope spreading*, que é a ativação de linfócitos específicos para outros antígenos que não aqueles que induziram a doença (89). Assim, é fácil pensar que uma redução da ativação das microglias está associada a uma menor progressão da doença.

No intuito de entender de que forma a indometacina é capaz de reduzir a progressão da doença, investigamos algumas das possíveis alterações que ela podia causar durante a indução da doença nos linfonodos drenantes. Para isso, no quinto dia após imunização, dia seguinte ao término do tratamento com indometacina, investigamos se as células presentes nesses linfonodos proliferam e morrem da mesma forma em resposta à estímulos *ex vivo* com o peptídeo específico. Embora as células derivadas de camundongos que foram tratados com indometacina apresentem uma frequência menor de células em proliferação, essas células proliferaram mais que o controle se analisarmos apenas os diferentes estímulos dentro do mesmo grupo. Se estas células estão proliferando mais e mesmo assim a doença está reduzida, talvez esteja ocorrendo um aumento da taxa de morte também. Entretanto, quando analisamos a morte nessas mesmas células não conseguimos observar nenhuma diferença nem entre os grupos/tratamentos (veículo e indometacina) nem entre os estímulos utilizados dentro do mesmo grupo. Isso pode estar relacionado a uma baixa sensibilidade da técnica utilizada, uma vez que a morte possa se concentrar dentro do grupo de linfócitos antígeno-específicos, que são minoria e estão dispersos entre os linfócitos não-específicos.

Ainda que não tenhamos visto nenhuma diferença com relação a morte, muitos trabalhos na literatura demonstram a importância da via do FAS/FASL na EAE. Estudos demonstraram que o FASL presente em células residentes no SNC, como os astrócitos, podem auxiliar na morte de linfócitos T que infiltram o tecido, contribuindo para a fase de remissão. Assim, quando o FASL é depletado especificamente de astrócitos, os camundongos não entram a fase de remissão da EAE, apresentando desmielinização e paralisia persistente (90)

Outra possibilidade de ação da indometacina é na geração das respostas nos linfonodos. Para observar isso, investigamos se haveria alteração na geração/freqüência de células produtoras de IFN-γ e IL-17. Através da técnica de ELISPOT detectamos uma quantidade menor de células no grupo tratado com indometacina, entretanto, mais uma vez não podemos afirmar que isso seja resultado de uma menor proliferação ou aumento da morte. Uma vez que essas as células produtoras dessas citocinas estão reduzidas, decidimos olhar para a produção de citocinas no sobrenadante das culturas celulares. Observamos, pela técnica de ELISA, que a concentração de IFN-γ e IL-17 também é menor nas células derivadas dos camundongos tratados com indometacina, corroborando com os resultados obtidos pelo ELISPOT e com dados da literatura que mostram a importância dessas citocinas no desenvolvimento da EAE. Também olhamos para a produção de IL-10 e IL-2, mas não conseguimos níveis detectáveis dessas citocinas nem no grupo controle nem no grupo experimental (dados não mostrados).

Além do seu efeito na proliferação e/ou morte das células existem muitos trabalhos demonstrando que a PGE_2 liberada em um contexto de apresentação de antígenos também participa no processo de diferenciação das subpopulações de linfócitos. Assim, à princípio, imaginamos que ao ser liberada na apresentação de antígenos pelas APCs, a PGE_2 fosse reconhecida pelo linfócito T favorecendo a diferenciação para Th1 e Th17 ao mesmo tempo em que reprimia a expressão do FASL nessas células, garantindo sua sobrevivência por mais tempo e o início da resposta. Foi demonstrado que a PGE_2 facilita a diferenciação para Th17 e a função efetora dessas células em modelo murino e humano via EP2 e EP4, e ao mesmo tempo diminui a produção de IFN-γ e IL-10 nessas células (91). Quando a PGE_2 foi simplesmente adicionada na cultura de linfócitos naives Th0 houve polarização para um perfil Th2, aumentando a produção de IL-4, IL-10 e IL-13 e muito pouco de IL-2, IFN-γ e TNF-α e -β (92).

Além dos possíveis efeitos causados pela indometacina investigados por nós, não podemos deixar de considerar outros efeitos descritos que a ausência de PGE_2 pode causar na literatura. Já está descrito, por exemplo, que o bloqueio da PGE_2 resulta em uma reduzida expressão da metaloproteinase de matrix 9 (MMP9 – *matrix metalloproteinase*) que leva a uma diminuição do infiltrado de monócitos e linfócitos T para o sistema nervoso central (64). Neste trabalho, este efeito não foi associado ao tratamento com indometacina, mas claro que é uma possibilidade a ser considerada.

Assim como qualquer tratamento *in vivo*, o estudo do efeito da droga apresenta uma grande complexidade, uma vez que esta pode ser absorvida por diferentes tecidos e apresentar

muitas reações adversas além das esperadas. Entretanto, para finalizarmos essa história, gostaríamos de provar que as células apresentadoras de antígeno são a principal fonte de PGE_2 na periferia, responsável pela indução da progressão da EAE. Para isso, futuros experimentos estão programados para serem realizados com células dendríticas derivadas de camundongos deficientes de mPGES-1 (93), a enzima responsável pela metabolização específica da PGE_2 . Atualmente, existem alguns estudos interessados em mostrar quais são as células importantes nessa sinalização, mas a comparação é feita entre células imunes periféricas e células residentes no sistema nervoso central, não deixando claro quais células periféricas (células apresentadoras de antígeno versus linfócitos) são as produtoras da PGE_2. Em um dos trabalhos foi demonstrado que a deleção de COX-2 ou de EP4 em células derivadas da medula óssea atrasa o início da doença. Entre outros efeitos foi demonstrado que há um número reduzido de linfócitos T, indo de acordo com os resultados que esperamos encontrar (64). Além disso, foi demonstrado um aumento de COX-2 nas células sanguíneas na fase pré-clínica.

6 CONCLUSÕES

- ✓ Camundongos fêmeas selvagens C57BL/6J submetidos à EAE e tratados com indometacina somente pelos 5 primeiros dias, fase de indução da doença, foi capaz de reduzir a progressão da doença de forma estatisticamente significativa, com menor incidência e menor severidade;
- ✓ Quando o tratamento com indometacina é realizado após início dos sinais clínicos, esta não apresenta nenhum efeito no desenvolvimento da doença;
- ✓ Há menor infiltrado no sistema nervoso central de camundongos tratados com indometacina, confirmado por análise histológica e citometria de fluxo;
- ✓ Há menor frequência e número absoluto de células produtoras de IL-17, IFN-γ e GM-CSF no sistema nervoso central no pico da doença dos camundongos tratados com indometacina;
- ✓ Há uma alteração na proporção entre células T efetoras e células T reguladoras no sistema nervoso central no dia do pico em camundongos tratados com indometacina;
- ✓ O tratamento com indometacina reduziu a proporção e o número absoluto de macrófagos infiltrantes e microglias ativadas no sistema nervoso central no dia do pico;
- ✓ Células de camundongos tratados com indometacina re-estimuladas *ex vivo* por MOG_{35-55} apresentaram redução na taxa de proliferação, embora a capacidade proliferativa pareça ser maior, mas não apresentaram alteração na taxa de morte pelo método utilizado;
- ✓ Quando re-estimuladas *ex vivo* pelo peptídeo MOG_{35-55}, há menor freqüência de células produtoras de IL-17 e menor produção de IL-17 e IFN-γ das células coletadas de camundongos tratados com indometacina.

REFERÊNCIAS[1]

1. Lai AY, Kondo M. T and B lymphocyte differentiation from hematopoietic stem cell. Semin Immunol. 2008;20(4):207-12.

2. Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T cell activation. Annu Rev Immunol. 2009;27:591-619.

3. Damsker JM, Hansen AM, Caspi RR. Th1 and Th17 cells: adversaries and collaborators. Ann N Y Acad Sci. 2010;1183:211-21.

4. Romagnani S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). Ann Allergy Asthma Immunol. 2000;85(1):9-18; quiz , 21.

5. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. Annu Rev Immunol. 2009;27:485-517.

6. Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. Curr Opin Immunol. 2007;19(6):652-7.

7. Lee Y, Awasthi A, Yosef N, Quintana FJ, Xiao S, Peters A, et al. Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. Nat Immunol. 2012;13(10):991-9.

8. Eyerich S, Eyerich K, Pennino D, Carbone T, Nasorri F, Pallotta S, et al. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. J Clin Invest. 2009;119(12):3573-85.

9. Crotty S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). Annu Rev Immunol. 2011;29:621-63.

10. Rudensky AY. Regulatory T cells and Foxp3. Immunol Rev. 2011;241(1):260-8.

11. Levings MK, Roncarolo MG. T-regulatory 1 cells: a novel subset of CD4 T cells with immunoregulatory properties. J Allergy Clin Immunol. 2000;106(1 Pt 2):S109-12.

12. Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. Annu Rev Immunol. 2012;30:531-64.

13. Nakayamada S, Takahashi H, Kanno Y, O'Shea JJ. Helper T cell diversity and plasticity. Curr Opin Immunol. 2012;24(3):297-302.

---

*De acordo com:
International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: http://www.icmje.org

14. Magombedze G, Reddy PB, Eda S, Ganusov VV. Cellular and population plasticity of helper CD4(+) T cell responses. Front Physiol. 2013;4:206.

15. Beriou G, Costantino CM, Ashley CW, Yang L, Kuchroo VK, Baecher-Allan C, et al. IL-17-producing human peripheral regulatory T cells retain suppressive function. Blood. 2009;113(18):4240-9.

16. Green DR. Fas Bim boom! Immunity. 2008;28(2):141-3.

17. Brenner D, Krammer PH, Arnold R. Concepts of activated T cell death. Crit Rev Oncol Hematol. 2008;66(1):52-64.

18. Sohn SJ, Rajpal A, Winoto A. Apoptosis during lymphoid development. Current opinion in immunology. 2003;15(2):209-16.

19. Xu G, Shi Y. Apoptosis signaling pathways and lymphocyte homeostasis. Cell Res. 2007;17(9):759-71.

20. Opferman JT. Apoptosis in the development of the immune system. Cell Death Differ. 2008;15(2):234-42.

21. O'Connor L, Strasser A, O'Reilly LA, Hausmann G, Adams JM, Cory S, et al. Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. The EMBO journal. 1998;17(2):384-95.

22. Hildeman DA, Zhu Y, Mitchell TC, Bouillet P, Strasser A, Kappler J, et al. Activated T cell death in vivo mediated by proapoptotic bcl-2 family member bim. Immunity. 2002;16(6):759-67.

23. Snow AL, Pandiyan P, Zheng L, Krummey SM, Lenardo MJ. The power and the promise of restimulation-induced cell death in human immune diseases. Immunol Rev. 2010;236:68-82.

24. Dhein J, Walczak H, Baumler C, Debatin KM, Krammer PH. Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). Nature. 1995;373(6513):438-41.

25. Ju ST, Panka DJ, Cui H, Ettinger R, el-Khatib M, Sherr DH, et al. Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. Nature. 1995;373(6513):444-8.

26. Green DR, Droin N, Pinkoski M. Activation-induced cell death in T cells. Immunol Rev. 2003;193:70-81.

27. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. Nature reviews. 2008;9(3):231-41.

28. Lavrik I, Golks A, Krammer PH. Death receptor signaling. J Cell Sci. 2005;118(Pt 2):265-7.

29. Peter ME, Budd RC, Desbarats J, Hedrick SM, Hueber AO, Newell MK, et al. The CD95 receptor: apoptosis revisited. Cell. 2007;129(3):447-50.

30. Breckenridge DG, Xue D. Regulation of mitochondrial membrane permeabilization by BCL-2 family proteins and caspases. Curr Opin Cell Biol. 2004;16(6):647-52.

31. Kaufmann T, Strasser A, Jost PJ. Fas death receptor signalling: roles of Bid and XIAP. Cell Death Differ. 2012;19(1):42-50.

32. Scaffidi C, Schmitz I, Zha J, Korsmeyer SJ, Krammer PH, Peter ME. Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. J Biol Chem. 1999;274(32):22532-8.

33. Brumatti G, Yon M, Castro FA, Bueno-da-Silva AE, Jacysyn JF, Brunner T, et al. Conversion of CD95 (Fas) Type II into Type I signaling by sub-lethal doses of cycloheximide. Exp Cell Res. 2008;314(3):554-63.

34. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. Nature. 2000;407(6805):770-6.

35. Jackson CE, Puck JM. Autoimmune lymphoproliferative syndrome, a disorder of apoptosis. Curr Opin Pediatr. 1999;11(6):521-7.

36. Siegel RM, Frederiksen JK, Zacharias DA, Chan FK, Johnson M, Lynch D, et al. Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. Science (New York, NY. 2000;288(5475):2354-7.

37. Badley AD, Parato K, Cameron DW, Kravcik S, Phenix BN, Ashby D, et al. Dynamic correlation of apoptosis and immune activation during treatment of HIV infection. Cell Death Differ. 1999;6(5):420-32.

38. Weinlich R, Bortoluci KR, Chehab CF, Serezani CH, Ulbrich AG, Peters-Golden M, et al. TLR4/MYD88-dependent, LPS-induced synthesis of PGE2 by macrophages or dendritic cells prevents anti-CD3-mediated CD95L upregulation in T cells. Cell Death Differ. 2008;15(12):1901-9.

39. Giuliano F, Warner TD. Origins of prostaglandin E2: involvements of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in human and rat systems. J Pharmacol Exp Ther. 2002;303(3):1001-6.

40. Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps RP. Prostaglandins as modulators of immunity. Trends Immunol. 2002;23(3):144-50.

41. Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, et al. Cyclooxygenase in biology and disease. Faseb J. 1998;12(12):1063-73.

42. Sreeramkumar V, Fresno M, Cuesta N. Prostaglandin E2 and T cells: friends or foes? Immunol Cell Biol. 2012;90(6):579-86.

43. Sugimoto Y, Narumiya S. Prostaglandin E receptors. J Biol Chem. 2007;282(16):11613-7.

44. Pica F, Franzese O, D'Onofrio C, Bonmassar E, Favalli C, Garaci E. Prostaglandin E2 induces apoptosis in resting immature and mature human lymphocytes: a c-Myc-dependent and Bcl-2-independent associated pathway. J Pharmacol Exp Ther. 1996;277(3):1793-800.

45. Hafler DA. Multiple sclerosis. J Clin Invest. 2004;113(6):788-94.

46. Gourraud PA, Harbo HF, Hauser SL, Baranzini SE. The genetics of multiple sclerosis: an up-to-date review. Immunol Rev. 2012;248(1):87-103.

47. McFarland HF, Martin R. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. Nat Immunol. 2007;8(9):913-9.

48. Nylander A, Hafler DA. Multiple sclerosis. J Clin Invest. 2012;122(4):1180-8.

49. Derwenskus J. Current disease-modifying treatment of multiple sclerosis. Mt Sinai J Med. 2011;78(2):161-75.

50. Cree BA. 2014 multiple sclerosis therapeutic update. Neurohospitalist. 2014;4(2):63-5.

51. Rivers TM, Sprunt DH, Berry GP. Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. J Exp Med. 1933;58(1):39-53.

52. Baxter AG. The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. Nature reviews. 2007;7(11):904-12.

53. t Hart BA, Gran B, Weissert R. EAE: imperfect but useful models of multiple sclerosis. Trends Mol Med. 2011;17(3):119-25.

54. Constantinescu CS, Farooqi N, O'Brien K, Gran B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). Br J Pharmacol. 2011;164(4):1079-106.

55. Kurschus FC. T cell mediated pathogenesis in EAE: Molecular mechanisms. Biomed J. 2015;38(3):183-93.

56. Bittner S, Afzali AM, Wiendl H, Meuth SG. Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG35-55) induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 mice. J Vis Exp. 2014(86).

57. Billiau A, Matthys P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. J Leukoc Biol. 2001;70(6):849-60.

58. Marta M, Andersson A, Isaksson M, Kämpe O, Lobell A. Unexpected regulatory roles of TLR4 and TLR9 in experimental autoimmune encephalomyelitis. Eur J Immunol. 2008;38(2):565-75.

59. Miranda-Hernandez S, Baxter AG. Role of toll-like receptors in multiple sclerosis. Am J Clin Exp Immunol. 2013;2(1):75-93.

60. Waldner H, Sobel RA, Howard E, Kuchroo VK. Fas- and FasL-deficient mice are resistant to induction of autoimmune encephalomyelitis. J Immunol. 1997;159(7):3100-3.

61. Sabelko-Downes KA, Russell JH, Cross AH. Role of Fas--FasL interactions in the pathogenesis and regulation of autoimmune demyelinating disease. J Neuroimmunol. 1999;100(1-2):42-52.

62. Sabelko-Downes KA, Cross AH, Russell JH. Dual role for Fas ligand in the initiation of and recovery from experimental allergic encephalomyelitis. J Exp Med. 1999;189(8):1195-205.

63. Reder AT, Thapar M, Sapugay AM, Jensen MA. Prostaglandins and inhibitors of arachidonate metabolism suppress experimental allergic encephalomyelitis. J Neuroimmunol. 1994;54(1-2):117-27.

64. Schiffmann S, Weigert A, Männich J, Eberle M, Birod K, Häussler A, et al. PGE2/EP4 signaling in peripheral immune cells promotes development of experimental autoimmune encephalomyelitis. Biochem Pharmacol. 2014;87(4):625-35.

65. Leo O, Foo M, Sachs DH, Samelson LE, Bluestone JA. Identification of a monoclonal antibody specific for a murine T3 polypeptide. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1987;84(5):1374-8.

66. Miller SD, Karpus WJ, Davidson TS. Experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse. Curr Protoc Immunol. 2010;Chapter 15:Unit 15.1.

67. Rao P, Knaus EE. Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. J Pharm Pharm Sci. 2008;11(2):81s-110s.

68. Hirota K, Duarte JH, Veldhoen M, Hornsby E, Li Y, Cua DJ, et al. Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. Nat Immunol. 2011;12(3):255-63.

69. McQualter JL, Darwiche R, Ewing C, Onuki M, Kay TW, Hamilton JA, et al. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor: a new putative therapeutic target in multiple sclerosis. J Exp Med. 2001;194(7):873-82.

70. Sonderegger I, Iezzi G, Maier R, Schmitz N, Kurrer M, Kopf M. GM-CSF mediates autoimmunity by enhancing IL-6-dependent Th17 cell development and survival. J Exp Med. 2008;205(10):2281-94.

71. Kobayashi T, Narumiya S. Function of prostanoid receptors: studies on knockout mice. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2002;68-69:557-73.

72. Kihara Y, Matsushita T, Kita Y, Uematsu S, Akira S, Kira J, et al. Targeted lipidomics reveals mPGES-1-PGE2 as a therapeutic target for multiple sclerosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(51):21807-12.

73. Hata AN, Breyer RM. Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. Pharmacol Ther. 2004;103(2):147-66.

74. Weber F, Meyermann R, Hempel K. Experimental allergic encephalomyelitis-prophylactic and therapeutic treatment with the cyclooxygenase inhibitor piroxicam (Feldene). Int Arch Allergy Appl Immunol. 1991;95(2-3):136-41.

75. 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. 2006;129(Pt 8):1984-92.

76. Kuerten S, Kostova-Bales DA, Frenzel LP, Tigno JT, Tary-Lehmann M, Angelov DN, et al. MP4- and MOG:35-55-induced EAE in C57BL/6 mice differentially targets brain, spinal cord and cerebellum. J Neuroimmunol. 2007;189(1-2):31-40.

77. Jin W, Dong C. IL-17 cytokines in immunity and inflammation. Emerg Microbes Infect. 2013;2(9):e60.

78. Jäger A, Dardalhon V, Sobel RA, Bettelli E, Kuchroo VK. Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes. J Immunol. 2009;183(11):7169-77.

79. Papatriantafyllou M. Cytokines: GM-CSF in focus. Nat Rev Immunol. 2011;11(6):370-1.

80. Hamilton JA. GM-CSF in inflammation and autoimmunity. Trends Immunol. 2002;23(8):403-8.

81. McWilliams IL, Rajbhandari R, Nozell S, Benveniste E, Harrington LE. STAT4 controls GM-CSF production by both Th1 and Th17 cells during EAE. J Neuroinflammation. 2015;12:128.

82. Codarri L, Gyülvészi G, Tosevski V, Hesske L, Fontana A, Magnenat L, et al. RORγt drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. Nat Immunol. 2011;12(6):560-7.

83. Anderton SM. Treg and T-effector cells in autoimmune CNS inflammation: a delicate balance, easily disturbed. Eur J Immunol. 2010;40(12):3321-4.

84. Korn T, Reddy J, Gao W, Bettelli E, Awasthi A, Petersen TR, et al. Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. Nat Med. 2007;13(4):423-31.

85. Guillemin GJ, Brew BJ. Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification. J Leukoc Biol. 2004;75(3):388-97.

86. Ginhoux F, Lim S, Hoeffel G, Low D, Huber T. Origin and differentiation of microglia. Front Cell Neurosci. 2013;7:45.

87. Benveniste EN. Role of macrophages/microglia in multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis. J Mol Med (Berl). 1997;75(3):165-73.

88. Yamasaki R, Lu H, Butovsky O, Ohno N, Rietsch AM, Cialic R, et al. Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system. J Exp Med. 2014;211(8):1533-49.

89. Gao Z, Tsirka SE. Animal models of MS reveal multiple roles of microglia in disease pathogenesis. Neurol Res Int. 2011;2011:383087.

90. Wang X, Haroon F, Karray S, Martina Deckert, Schlüter D. Astrocytic Fas ligand expression is required to induce T-cell apoptosis and recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. Eur J Immunol. 2013;43(1):115-24.

91. Boniface K, Bak-Jensen KS, Li Y, Blumenschein WM, McGeachy MJ, McClanahan TK, et al. Prostaglandin E2 regulates Th17 cell differentiation and function through cyclic AMP and EP2/EP4 receptor signaling. J Exp Med. 2009;206(3):535-48.

92. Demeure CE, Yang LP, Desjardins C, Raynauld P, Delespesse G. Prostaglandin E2 primes naive T cells for the production of anti-inflammatory cytokines. Eur J Immunol. 1997;27(12):3526-31.

93. Samuelsson B, Morgenstern R, Jakobsson PJ. Membrane prostaglandin E synthase-1: a novel therapeutic target. Pharmacol Rev. 2007;59(3):207-24.