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

## 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-$\gamma^+$, 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 $E_2$.

# 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-$\gamma$, TNF-$\alpha$ 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-$\beta$ 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).

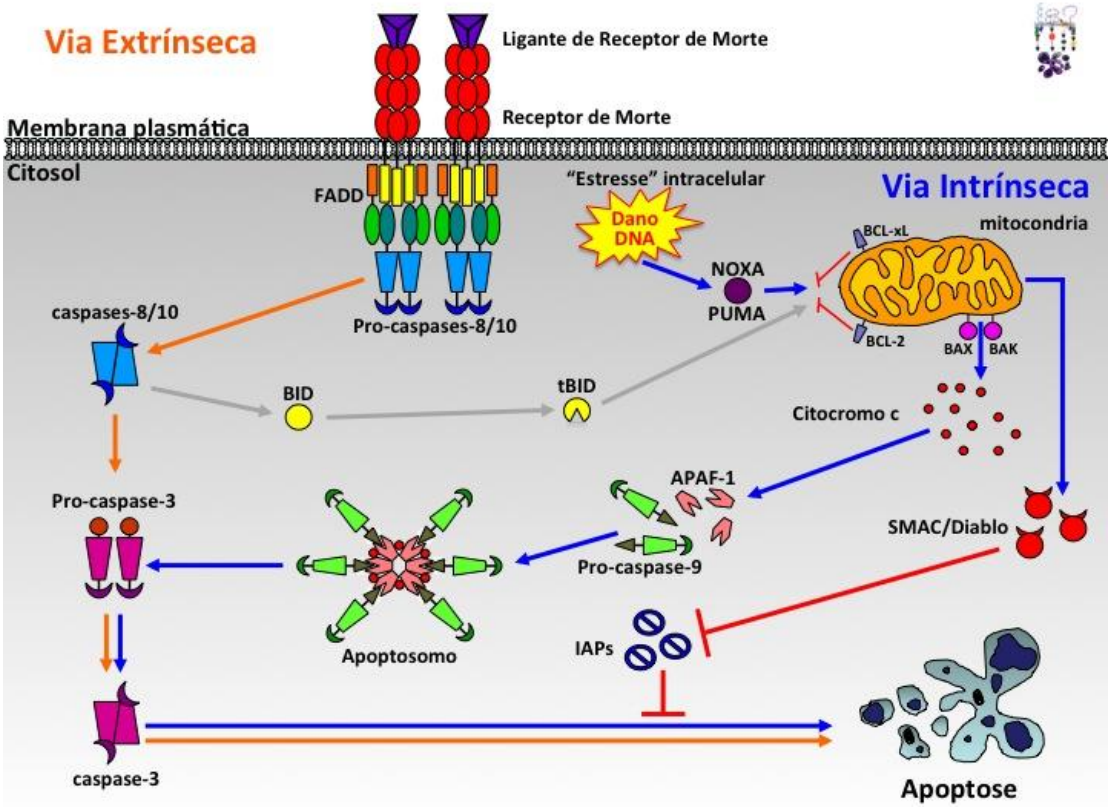

**Figura 1.** *Apoptose.* Sinalização do processo de apoptose pela via extrínseca, induzida através da interação entre receptores de morte e seus respectivos ligantes e pela via intrínseca, ativada por estresses intracelulares. Ambas as vias resultam numa via comum de morte, na qual há ativação da caspase-3 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.**

## 4 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.