JENNIFER ROCHA RODRIGUES

**PAPEL DO GPER NA MELHORA DA NEUROINFLAMAÇÃO NO
MODELO DE ENCEFALOMIELITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL EM
CAMUNDONGOS FÊMEAS C57B1/6: PARTICIPAÇÃO DOS ASTRÓCITOS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação
em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Carolina Demarchi Munhoz

Versão Original

SÃO PAULO

2017

RESUMO

Rodrigues, J.R. Papel do GPER na melhora da neuroinflamação no modelo de encefalomielite autoimune experimental em camundongos fêmeas C57bl/6: participação dos astrócitos. [dissertação (Mestrado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

A Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE) é um modelo animal para o estudo da Esclerose Múltipla (EM), uma doença autoimune na qual as células do sistema imune atacam a bainha de mielina e os oligodendrócitos, levando a desmielinização, perda axonal e consequente morte neuronal. Os astrócitos constituem um fator importante na patologia da doença e na modulação da neuroinflamação. O estrógeno (E2) também pode atuar nesses processos, agindo de modo diferente dependendo do receptor ao qual se liga. Enquanto sua ação via receptores nucleares ER α e ER β no modelo de EAE está bem caracterizada, pouco se sabe sobre a ação do E2 via GPER, o receptor de estrógeno acoplado a proteína G, neste contexto. Sabendo-se que o GPER está presente nos astrócitos, verificamos se o tratamento com G1 (agonista seletivo de GPER) altera o curso da doença e modula o processo inflamatório e os astrócitos na medula espinhal de camundongos fêmeas C57bl/6. Observamos que o tratamento com o G1 (3 mg/Kg, S.C., por três dias, a partir do 5º dia após a indução da EAE) atenuou o escore clínico no pico da doença, porém aumentou o infiltrado celular na medula espinhal de camundongos doentes. Ainda na medula de animais doentes, o G1 diminuiu o número de astrócitos e aumentou a espessura e ramificações dessas células, sem alterar a expressão de GPER, indicando a participação do GPER na patologia da EAE e um efeito modulador do G1 nos astrócitos.

Palavras-chave: Receptor de estrógeno acoplado a proteína G (GPER), Encefalomielite autoimune experimental, Astrócitos, Neuroinflamação.

ABSTRACT

Rodrigues, J.R. Role of GPER in the improvement of neuroinflammation in the experimental autoimmune encephalomyelitis in female mice C57bl/6: involvement of astrocytes. [[asters thesis (Pharmacology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas; 2017.

Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) is an animal model for Multiple Sclerosis, an autoimmune disease in which cells of the immune system attack the myelin sheath and oligodendrocytes, leading to demyelination, axonal loss, and consequent neuronal death. Astrocytes are important players in the pathology of the disease and in the modulation of neuroinflammation. Estrogen (E2) may also participate in these processes, acting differently depending on the receptor to which it binds. While its action via nuclear receptors ER α and ER β in the EAE model is well characterized, little is known about the action of E2 via GPER, the G-coupled protein estrogen receptor, in this context. Since GPER is expressed in astrocytes, we verified whether G1 (a selective GPER agonist) modifies the course of the disease and modulates the inflammatory process and astrocytes in the spinal cord of C57bl/6 female mice. We observed that the treatment with G1 (3 mg / kg, SC, for three days from the 5th day after EAE induction) attenuated the clinical scores at the peak of the disease, however increased the cellular immune infiltrate in the spinal cord of diseased mice. Yet in the spinal cord, G1 decreased the number of astrocytes and increased the thickness and ramifications of these cells without modifying the expression of GPER, indicating the participation of this estrogen receptor in the pathology of EAE and a modulatory effect of G1 on astrocytes.

Keywords: G-coupled protein estrogen receptor (GPER), Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, astrocytes, neuroinflammation.

1 Introdução

1.1 Esclerose Múltipla

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença inflamatória do Sistema Nervoso Central (SNC), de base auto-imune, onde as células do sistema imune atacam componentes específicos da bainha de mielina ou dos oligodendrócitos, levando à desmielinização, perda axonal e gliose na substância branca da medula espinhal e do encéfalo (1, 2).

A doença geralmente acomete jovens adultos e o início dos sintomas ocorre entre 20 e 40 anos. Predomina em indivíduos da raça caucasiana e a proporção de mulheres afetadas é cerca de duas vezes maior que homens (3). A partir de um levantamento feito pela Federação Internacional de Esclerose Múltipla (MSIF) junto à Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2013, estima-se que em torno de 2,3 milhões de pessoas ao redor do mundo desenvolveram EM (4). No Brasil, segundo a Associação Brasileira de Esclerose Múltipla (ABEM), a doença afeta cerca de 35 mil pessoas (5).

1.2 Fatores etiológicos

A etiologia da EM não está plenamente estabelecida. Sabe-se que se trata de uma doença multifatorial, na qual fatores ambientais, genéticos e imunológicos estão associados à sua susceptibilidade, mas a causa ainda permanece desconhecida (6, 7). Diversos estudos epidemiológicos vêm associando a prevalência da EM com a latitude geográfica. Países com uma maior latitude, em ambos os hemisférios, apresentam maior incidência da doença (8, 9). Outros fatores ambientais possíveis incluem infecções virais, especialmente o Epstein-Barr (10, 11), tabagismo (12), baixa exposição ao sol (6) e deficiência de vitamina D (13). Estudos genéticos associaram variações dentro do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) à suscetibilidade da EM. Outros loci também foram associados à frequência da doença (14).

Figura 1- Prevalência de Esclerose Múltipla no mundo.

Prevalência de Esclerose Múltipla no mundo. Fonte: Atlas of MS 2013 (5)

1.3 Aspectos Clínicos

Os sintomas variam de acordo com o tipo de neurônio afetado (excitatório ou inibitório) e com sua localização no SNC. Muitos sintomas estão relacionados a danos no corpo caloso, região que conecta os dois hemisférios cerebrais, composta por fibras maiores e, por isso, é a estrutura com maior quantidade de substância branca (15). As manifestações clínicas iniciais mais comuns são distúrbios visuais decorrentes de neurite óptica (geralmente unilaterais, incluindo perda parcial ou total da visão, movimentos oculares dolorosos e visão dupla ou embaçada), déficits sensoriais (parestesias, dormência ou prurido nas extremidades ou tronco, tonturas, vertigem) e déficits motores (fraqueza, tremores, dificuldade de coordenação, marcha instável). Outros sintomas como fadiga, urgência ou retenção urinária, disfunção sexual, depressão, intolerância ao calor, dor, fenômeno de Lhermitte, disfunção cognitiva, espasticidade e nistagmo também podem aparecer em menor proporção (16, 17). A dor é uma característica comum, resultante de lesões na via espinotalâmica, via sensorial que transmite informações nociceptivas da medula espinhal para o tálamo (18).

Clinicamente, a EM é subdividida em quatro grupos. O tipo mais comum de EM é a Remitente-Recorrente (EMRR), que ocorre em aproximadamente 55% dos casos. Caracteriza-se por surtos ou ataques seguidos por recuperação parcial ou total dos sintomas e pela remielinização das fibras nervosas afetadas. Assim, os danos são parcialmente reversíveis. As taxas de recidiva variam entre os pacientes com média de 1 a 2 episódios por ano. A EM Secundária Progressiva (EMSP) é o segundo tipo mais comum e representa cerca de 30% dos casos. Inicia-se como a EMRR, mas ao longo dos anos ocorre uma diminuição ou cessação dos períodos remitentes, levando a um avanço progressivo e irreversível dos sintomas. Outro tipo de EM é a Progressiva Primária (EMPP) que ocorre em aproximadamente 10% dos casos de EM. EMPP é caracterizada pela incapacidade progressiva sem estágios remitentes. Assim, os indivíduos sofrem com danos irreversíveis, aumento das deficiências, com pouco ou nenhum alívio sintomático. Por fim, a EM Progressiva Recidivante (EMPR) ocorre em cerca de 5% dos casos e é caracterizada pela incapacidade progressiva a partir do início dos sintomas, semelhante a EMPP, mas também envolve ataques agudos ou recaídas (19). O tipo de evolução também está relacionado a características genéticas de cada indivíduo (20). A EMRR geralmente se inicia na segunda ou terceira década de vida e tem uma predominância do sexo feminino de aproximadamente 2:1. Já a incidência de EMPP se inicia mais tardiamente e acomete homens e mulheres na mesma proporção (14).

Dados clínicos e de ressonância magnética (RM) sugerem que a EMRR está relacionada a inflamação e a formação de novas lesões na substância branca. Nas remissões, ocorre um declínio da inflamação e remielinização das áreas afetadas, principalmente nas margens das placas das lesões e, em menor grau, em toda a lesão. Na remielinização completa, originam-se as áreas de "sombra", as quais são zonas bem demarcadas com reduzida densidade de mielina (21).

Na fase progressiva da EM raramente surgem novas lesões desmielinizantes, mas ocorre uma expansão gradual nas margens dessas lesões. A remielinização é incompleta ou não ocorre. E, além disso, ocorre uma atrofia difusa da substância cinzenta, pela degeneração axonal (22). Lesões axonais irreversíveis, cicatrizes gliais e esgotamento de células precursoras de oligodendrócitos são resultados de episódios

repetidos da atividade da doença e levam à perda progressiva da função neurológica (23). Essas observações sugerem que a fase inicial da doença é um processo inflamatório, enquanto que a fase progressiva é um processo neurodegenerativo, o qual se desenvolve, pelo menos em parte, independente de inflamação (24). Isso justifica a ineficácia dos tratamentos anti-inflamatórios após a evolução da doença. Os tratamentos clínicos atuais visam diminuir a inflamação ao invés de prevenir a neurodegeneração (20).

1.4 *Modelo Animal*

A Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE) é um modelo animal utilizado para compreender melhor a EM devido à similaridade em vários aspectos clínicos, neuropatológicos e imunológicos. A indução da EAE apresenta características diversas de acordo com a espécie de animal utilizada e diferentes modelos reproduzem aspectos específicos da imunopatologia da doença humana (25).

A EAE pode ser induzida pela imunização ativa com proteína ou peptídeo presente na mielina ou nos oligodendrócitos, tais como a proteína básica de mielina (MBP), proteína proteolipídica (PLP) ou glicoproteína oligodendrocítica de mielina (MOG) (26). A indução da EAE através da transferência de linfócitos T ativados, retirados de um animal previamente imunizado com MBP, demonstrou a importância dessas células na patogênese da doença (27).

O modelo de indução da EAE em camundongos C57BL/6 com MOG é caracterizado por paralisia ascendente dos membros posteriores, infiltração de células inflamatórias T encefalitogênicas, ativação microglial e astrocitária, além da destruição da mielina, oligodendrócitos e axônios, aspectos similares aos encontrados na EM (28).

Geralmente, utilizam-se outros agentes junto com a imunização como a toxina Pertussis, proveniente da bactéria *Bordetella pertussis*. Estudos indicam que essa toxina é capaz de promover maior permeabilidade na BHE e facilitar, portanto, a migração de células T autorreativas, e a consequente indução da EAE (29).

Embora existam diferenças entre EAE e EM, o modelo permite entender melhor os mecanismos celulares e moleculares envolvidos no processo inflamatório e propor

novas abordagens terapêuticas. Todavia, a extrapolação dos resultados obtidos em modelos de EAE para ensaios clínicos de EM é apenas parcialmente bem-sucedida e uma das possíveis razões é o fato da doença ser induzida e não ser de natureza auto-imune (25). Outra possibilidade é a diferença na composição das células do sistema imunológico e o tipo de resposta evocada. Na EM o principal componente do infiltrado inflamatório são linfócitos CD8⁺, enquanto na EAE, são linfócitos CD4⁺, isso afeta possíveis tratamentos, por exemplo, o uso de IFN- γ é benéfico para os animais com EAE enquanto exacerba o quadro de pacientes com EM enquanto o IFN- β , que piora o quadro de EAE, é utilizado como tratamento de pacientes com EM (30, 31).

1.5 *Neuroglia*

As células da glia são as mais abundantes no SNC e podem ser divididas em três classes: oligodendrócitos e astrócitos (ambos de origem ectodérmica, denominados macroglia) e microglia (de origem monocítica) (32).

Os oligodendrócitos são células que produzem a bainha de mielina, que envolve e protege alguns axônios neuronais. A perda desse isolamento leva à perda de função e à degeneração dos axônios (33).

As microglias são consideradas macrófagos residentes do SNC e protegem o microambiente, especialmente quando a função neuronal é ameaçada (34).

Os astrócitos são as células mais abundantes do SNC de mamíferos (35), produzem moléculas de matriz extracelular e mantêm a homeostasia local, controlando a concentração de íons, o pH, estoque de glicogênio e a depuração de resíduos neuronais (36). As ramificações astrocitárias ajudam na formação e manutenção da integridade da barreira hematoencefálica (BHE) (37) e a secreção de fator de transformação do crescimento (TGF- β) pelos astrócitos pode estreitar as junções entre as células endoteliais diminuindo a permeabilidade da BHE (38). Os astrócitos também secretam fatores importantes para a sobrevivência de neurônios e de outras células da glia (39).

1.6 Astrócitos na EM

Muitas situações patológicas que afetam o sistema nervoso central (SNC) desencadeiam uma resposta celular envolvendo interações complexas entre diferentes células, até mesmo entre células do SNC e células externas ao SNC provenientes da circulação. Dependendo da duração e gravidade da lesão, esta resposta pode induzir um mecanismo patológico secundário que pode, em última análise, induzir uma lesão tecidual. Essa resposta do SNC ao insulto é conhecida como gliose reativa, que visa lidar com o estresse agudo, limitar os danos e restaurar a homeostase (40).

Durante o processo inflamatório, ocorrem alterações na morfologia e fisiologia dos astrócitos que são acompanhadas da liberação de outros mediadores inflamatórios e fatores bioativos, amplificando, desse modo, a inflamação (41).

Os astrócitos secretam citocinas (*e.g.* IL-1, IL-6, IL-12, IL-23 e TNF- α) que podem direcionar a resposta inflamatória, direta ou indiretamente, para Th1 (subpopulação de linfócitos T CD4⁺), induzir síntese de imunoglobulinas pelos linfócitos B ativados, induzir diferenciação de monócitos em macrófagos e em maiores concentrações, danificar a BHE (42). Secretam também quimiocinas (*e.g.* RANTES (CCL5), MCP-1 (CCL2), IL-8 (CXCL8) e IP-10 (CXCL10)) capazes de atrair monócitos e linfócitos ativados da corrente sanguínea para o SNC (42, 43). Também expressam moléculas de adesão (V-CAM e I-CAM e e-selectinas) que favorecem a migração de células do sistema imune no SNC (43).

Na EAE, verificou-se que a IL-6 promove proliferação astrocitária, e atua na maturação e ativação de linfócitos T no timo (44). IL-6 também é responsável pela diferenciação de linfócitos T CD4⁺ para a subpopulação Th17 (45).

A quimiocina MCP-1 é uma molécula quimioatrativa para monócitos e linfócitos T ativados, células essas que expressam o receptor para MCP-1 (CCR2). Estudos com animais deficientes de IL-6 ou CCR2 mostraram que estes foram resistentes à indução da EAE (44).

Devido à capacidade de expressão de moléculas de MHC de classe I e II, bem como moléculas co-estimulatórias como CD80 e CD86 após estímulo de IFN- γ ,

astrócitos podem ter função de célula apresentadora de antígeno (APC) não profissional e, assim, ativarem linfócitos CD8⁺ e CD4⁺ respectivamente (46).

A microglia ativada produz um grande número de fatores solúveis, como citocinas pró-inflamatórias (*e.g.* IL-1, TNF- α , IFN- γ), espécies reativas de oxigênio (EROs) ou de nitrogênio (ERNs) que intensificam o processo inflamatório e atraem os astrócitos para a região de desmielinização, onde estes formam uma cicatriz ao redor da lesão (47). Além disso, essas citocinas são capazes de alterar a morfologia dos astrócitos e prejudicar sua função, precedendo o processo de desmielinização (48).

1.7 *Imunopatologia*

A principal característica patológica da EM é a presença de áreas focais de desmielinização causada pela inflamação na substância branca no cérebro e na medula espinhal (19). Essa reação inflamatória é composta tanto por microglia, células residentes do SNC, como também por linfócitos e macrófagos ativados que atravessaram a barreira hematoencefálica (1).

Primeiramente, linfócitos autorreativos para proteínas de mielina devem evadir os mecanismos de tolerância central e periférica. Ainda no timo, os linfócitos imaturos que reconhecerem antígenos próprios sofrem deleção clonal. Porém, os linfócitos T maduros autorreativos ainda podem passar pelo processo de tolerância periférica, tornando-se células anérgicas ou sofrerem apoptose. Essas células também podem ser suprimidas através das células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ (49). Verificou-se em alguns estudos que a população de células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ é bem menor em pacientes com EM, comparadas a indivíduos saudáveis (50).

Essas células T autorreativas, presentes no repertório imune normal, devem ser ativadas e adquirir a capacidade de permear a BHE (51). Citocinas liberadas por elas podem danificar a BHE, facilitando o acesso ao SNC (52). Após as células T atravessarem a BHE, ocorre uma interação local com as células apresentadoras de antígeno (APCs) do SNC (53).

Ao serem ativadas, as células T autorreativas passam a expressar um conjunto de moléculas de adesão e enzimas. As moléculas de adesão LFA-1 (CD11a/CD18) e VLA-

4 se ligam a ICAM-1 e VCAM-1, respectivamente, conferindo-lhes a capacidade de aderirem ao endotélio vascular, ao passo que as enzimas, como metaloproteinases de matriz, são essenciais para o processo de transmigração (54, 55).

Ocorre uma polarização dos linfócitos T CD4⁺ ativados para as populações de células efectoras Th1 e Th17. Essas duas subpopulações estão envolvidas na patologia tanto da EAE como da EM. Os linfócitos Th1 necessitam de IL-12 para a sua diferenciação e secretam IFN- γ , IL-2 e TNF- α . O IFN- γ induz a expressão de MHC de classe II no SNC e desencadeia a produção de quimiocinas que atraem e ativam macrófagos (56). Alguns estudos em cultura de célula indicaram que o IFN- γ , leva à diminuição da expressão gênica de mielina e de proteínas importantes para a morfologia normal dos oligodendrócitos, podendo levar a morte celular por apoptose ou por necrose, de acordo com o grau de desenvolvimento da célula (57).

A segunda população de linfócitos efetores, Th17, necessita de TGF- β , IL-6 e IL-1 para sua diferenciação e secretam IL-17A, IL-17F e IL-22. Essas células tem a capacidade de produzir e induzir a produção de mediadores inflamatórios por outras células, exacerbando o processo inflamatório no SNC (56).

As células inflamatórias encontram-se, sobretudo, na região perivascular, porém podem se infiltrar difusamente pelo parênquima. A composição do infiltrado inflamatório pode variar, mas os linfócitos costumam ser mais predominantes nas lesões ativas. O dano iniciado pelas células T autorreativas é um forte estímulo para o recrutamento de macrófagos e outros mecanismos efetores (58).

Vale ressaltar que uma diferença entre a patologia da EM e da EAE é que na primeira o principal componente do infiltrado inflamatório são linfócitos T CD8⁺, enquanto na segunda, são linfócitos T CD4⁺ (25).

Macrófagos e microglia ativados produzem um grande número de fatores solúveis, como citocinas pró-inflamatórias (*e.g.* IL-1, TNF- α , IFN- γ), espécies reativas de oxigênio (EROs) ou de nitrogênio (ERNs), ativadores do sistema complemento, enzimas proteolíticas e lipolíticas, aminoácidos excitatórios, que podem induzir bloqueio funcional ou causar danos estruturais aos axônios (59).

A produção dessas citocinas e do óxido nítrico (NO) pela microglia atrai os astrócitos para a região de desmielinização, onde estes formam uma cicatriz ao redor

da lesão (47). Além disso, essas citocinas são capazes de alterar a morfologia dos astrócitos e prejudicar sua função. Essas alterações estruturais e funcionais nos astrócitos também precedem uma desmielinização (48).

Embora os linfócitos B sejam raros nas infiltrações de placas ativas na EMRR, eles tornam-se cada vez mais importantes com a cronicidade da doença. Os anticorpos podem causar desmielinização diretamente, possivelmente através da ativação de sistema complemento e opsonização da bainha de mielina e oligodendrócitos, facilitando a fagocitose pelos macrófagos ativados (60).

As próprias células T podem mediar ações potencialmente tóxicas para os oligodendrócitos, como a liberação perforinas (Granzima B), a interação do receptor Fas com o ligante Fas (FasL) e a citotoxicidade mediada pela interação de células T CD8+ com o MHC de classe I em APCs. O MHC de classe I é altamente expresso nas lesões de EM, não só em células inflamatórias, mas também em neurônios e células da glia (61).

A maioria das células T que entram no cérebro morre por apoptose. A fagocitose dos fragmentos de células T apoptóticas por células microgliais parece proporcionar um circuito de retroalimentação negativo da inflamação. Os sinais decisivos que induzem essa apoptose não são bem compreendidos, mas parece haver uma contribuição da sinalização de TNF- α ou esteroides endógenos (62, 63).

A eliminação dos macrófagos também se dá por apoptose, podendo ocorrer pela presença ou ausência de citocinas, mediada por citotoxicidade de células T, por produtos da ativação de macrófagos, como óxido nítrico, ou por esteroides endógenos (64). A morte dessas células diretamente relacionadas ao processo inflamatório da EM contribui para a resolução, ainda que momentânea, da fase remissiva da doença.

Dentro das placas ativas, que surgem durante as fases iniciais da EM, ocorre grande remielinização através da diferenciação e maturação das células progenitoras de oligodendrócito (OPC) recrutadas para o local da desmielinização. Contudo, nas fases mais tardias da doença, e em particular em doentes com EM progressiva, acredita-se que a remielinização seja escassa ou ausente pelo esgotamento das OPC. Na fase progressiva, ocorre uma expansão lenta das placas inflamadas, pela presença

de microglia ativada degradando a mielina indicando um processo lento de desmielinização (65).

1.8 Tratamento

Como ainda não há cura para a doença, os atuais tratamentos para a EM visam aliviar os sintomas, reduzir a frequência e a duração dos ataques, minimizar os déficits neurológicos e prevenir a progressão da doença (66). São utilizados interferon- β (IFN- β) ou acetato de glatiramer para diminuir o processo inflamatório e desacelerar a progressão da doença (67). Corticosteroides, como a metilprednisolona, são utilizados para acelerar a recuperação na fase aguda da doença, porém, estudos indicam que a tendência dos corticosteroides em acelerar a recuperação de recaídas pode diminuir com o tempo (20). Imunossupressores têm sido utilizados no tratamento da EM quando os outros métodos não alcançam sucesso na estabilização dos sintomas (68). Todavia, os tratamentos atuais apresentam eficácia apenas na fase aguda da doença, tendo um benefício limitado quando os pacientes entram na fase progressiva (20).

Os mecanismos de lesão tecidual na EM são heterogêneos. As alterações estruturais e imunológicas observadas nas lesões são diferentes entre pacientes e até mesmo no mesmo paciente ao longo dos estágios da doença. Por exemplo, em alguns pacientes, as lesões são constituídas apenas por células T e macrófagos, enquanto que em outros, há profunda acumulação de imunoglobulinas e componentes do sistema complemento (69). Isto implica que as estratégias terapêuticas devem levar em conta não apenas as diferenças na patogênese entre as fases da EM, mas também as potenciais diferenças interindividuais nos pacientes (70).

1.9 Estrógeno

Os hormônios sexuais atuam de diferentes maneiras e em diferentes células no SNC. Seus efeitos podem ocorrer diretamente nos neurônios ou indiretamente, através das células gliais. A atuação dos esteroides influencia desde o desenvolvimento do SNC até suas diferentes funções (71).

As diferenças sexuais predisõem os indivíduos a diferentes doenças autoimunes. Os hormônios femininos influenciam na patogênese das doenças inflamatórias e autoimunes e podem contribuir para a alta incidência de certas autoimunidades em mulheres, *e.g.* EM, lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatoide (72).

Em relação à EM, muitos trabalhos mostraram que a variação dos níveis hormonais em diferentes períodos de vida promove alterações nos quadros da doença. Durante a gravidez, período no qual os níveis de estrógeno e progesterona estão mais elevados, sobretudo no terceiro trimestre, ocorre uma redução nas taxas de recidiva. Porém, verificava-se recorrência dos sintomas no primeiro trimestre após o parto, correlacionado à queda hormonal (73, 74).

O estrógeno (E2, 17 β -estradiol) é um hormônio sexual, sintetizado prevalentemente nos ovários durante a fase reprodutiva das mulheres (da puberdade à menopausa), mas também pode ser produzido, em ambos os sexos, em tecidos não-endócrinos como fígado, tecido adiposo e encéfalo através da enzima aromatase (75). Além da sua função na reprodução, o E2 regula uma gama de efeitos nos tecidos corporais, como, mamas, sistema cardiovascular, ossos e encéfalo (76).

Os efeitos neuromoduladores do estrógeno têm sido demonstrados em lesões do SNC, isquemia, neurodegeneração e envelhecimento. Este hormônio foi caracterizado como neuroprotetor por evitar a morte celular, aumentar a sobrevivência neuronal, estimular sinaptogênese e regular a neurotransmissão em diversas situações experimentais (77) e também na regeneração da mielina (78).

O E2 é lipofílico e exerce seus efeitos em diferentes células através de receptores intracelulares ER α e ER β . Quando o estrógeno se liga a esses receptores, ocorre uma translocação desse complexo para o núcleo, onde são capazes de atuar como promotores de genes específicos, atuando na regulação da transcrição dos mesmos ou recrutar proteínas co-regulatórias que ativam ou reprimem a transcrição de outros genes (72). Esse mecanismo de sinalização pela ação genômica é conhecido como via clássica (79). A distribuição dos receptores ER α e ER β varia entre os tecidos e a ação resultante da ativação desses receptores pode ser sinérgica ou antagônica (80). Vale lembrar que as células da glia expressam ambos receptores (81).

Dentre as muitas células responsivas ao estrógeno, encontra-se também os astrócitos. Na região hipotalâmica, essas células, estimuladas pelo estrógeno, participam da síntese de progesterona (82).

Além do E2, o estriol (E3), a progesterona e a testosterona podem modular as respostas imunológicas (83), tanto no perfil de produção de citocinas e quimiocinas, como na proporção de tipos de células do sistema imune. Além disso, essa diferença ocorre durante as fases do ciclo menstrual com as variações nas concentrações dos hormônios femininos (84).

Baixas doses de estrógeno estão associadas a um perfil de resposta Th1, com aumento da imunidade celular e citocinas pró-inflamatórias, enquanto que altas doses de estrógeno promovem um perfil Th2, com resposta humoral e citocinas anti-inflamatórias (85, 86).

Na gravidez, a supressão das respostas inflamatórias e o aumento da tolerância imunológica são requeridas para a própria manutenção da gestação. Os modelos de EAE sugerem que durante a prenhez, ocorre supressão das respostas Th1 e Th17, bem como das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ and IL17 e em contra-partida, ocorre um aumento das células Treg e da citocina anti-inflamatória IL-10 (87).

Um estudo mostra que o E2 na EAE é capaz de reduzir o início da resposta antígeno-específica à MOG nos órgãos linfoides secundários e a limitar a diferenciação dos linfócitos a Th1 e direcionar para Th2 (88). Já a deficiência de estrógeno pode direcionar essa diferenciação para Th17 (89).

As mulheres apresentam um maior número de células T CD4⁺ e células T regulatórias (T_{Reg}) e o aumento dos níveis de estrógeno também aumenta T_{Reg}, que são importantes na manutenção da tolerância imunológica pela supressão de células T autorreativas (50). Além disso, o estrógeno afeta a expressão de receptores de quimiocinas em células T, por exemplo, através do aumento de CCR5 e CCR1 em células T CD4⁺, envolvidos no recrutamento de leucócitos (90).

Na imunidade inata, o estrógeno age sobre macrófagos e monócitos regulando a expressão de CD16. A diminuição dos níveis de estrógeno leva ao aumento na expressão de CD16, que quando ativado desencadeia a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e TNF- α (91).

O estrógeno também afeta a células do endotélio vascular modulando a expressão de moléculas de adesão e quimiocinas e isso influencia no recrutamento de células e consequentemente, no processo de inflamação (92).

O estrógeno apresenta efeitos protetores na EAE que são dependentes do receptor estimulado (93). Por exemplo, a administração de ligantes específicos para ER α antes da indução de EAE impede o desenvolvimento da doença (94), por gerar um efeito anti-inflamatório, reduzindo os níveis de citocinas pró-inflamatórias como TNF α , IFN- γ e IL-6 nas fases iniciais e tardias da EAE, além de diminuir a infiltração de macrófagos e linfócitos (94).

Já o tratamento com ligantes específicos para ER β não altera o início da doença, pois não é capaz de diminuir o infiltrado de células inflamatórias nem de modular as citocinas pró-inflamatórias. Porém, tem um efeito neuroprotetor na fase tardia da EAE, visto pela diminuição do escore clínico. Esse efeito se dá, provavelmente, pelo aumento da maturação dos oligodendrócitos, aumento na produção de mielina e diminuição do dano axonal (46, 95, 96).

São inúmeras as evidências de que o estrógeno apresenta diversos mecanismos que levam à proteção contra doenças autoimunes. Todavia, as mulheres são as mais acometidas por essas doenças. A razão provável para essa aparente contradição é a constante flutuação dos níveis hormonais ao longo da vida (72).

1.10 GPER

Ao longo dos anos, muitos estudos sugeriram a existência de receptores de estrogênio de sinalização rápida. No final dos anos 90, diferentes grupos clonaram um receptor GPCR (*G-protein coupled receptor*) órfão. Em 2005, foi identificado um receptor de estrógeno acoplado à proteína G – GPER (*G-protein coupled estrogen receptor*). A ação do estrógeno através desses receptores ocorre pela chamada via não-clássica e apresenta uma sinalização mais rápida, levando a mobilização de cálcio intracelular, ativação de proteínas quinases, como ERK e PI3K, e fatores de transcrição (97, 98).

Uma das ações do E2 via GPER é a ativação da via Trifosfato de inositol-fosfolipase C (IP3/PLC) que causa a liberação dos estoques intracelulares de cálcio (97,

98). Nos astrócitos, essa elevação intracelular de cálcio facilita a síntese de progesterona por essas células, sendo importante para mecanismos de retroalimentação no hipocampo (99). Além disso, a elevação dos níveis de cálcio via GPER aumenta a ativação e internalização de $ER\alpha$, levando a sinalização clássica (genômica) (82).

Ao contrário dos outros receptores, o GPER é fisiologicamente seletivo para o 17β -estradiol, não sendo alvo de outros hormônios como o isômero 17α -estradiol, a progesterona, a testosterona ou o cortisol (100).

Estudos subsequentes levaram a descoberta de três substâncias capazes de se ligarem seletivamente ao GPER: G1 como agonista e G15 e G36 como antagonistas. Embora essas substâncias sejam ferramentas farmacológicas bastante úteis, não está claro os mecanismos pelas quais elas modulam a sinalização via GPER (101).

Figura 2- Estrutura química dos ligantes de GPER.

Estrutura química dos ligantes de GPER. Fonte: (101)

O GPER é expresso em células do sistema imune de humanos e camundongos como macrófagos e linfócitos T, com uma forte expressão nas Treg humanas (102). Estudos em ratos demonstraram que o GPER está expresso em todos os estágios de maturação dos oligodendrócitos e que o G1 pode atuar na proliferação de OPCs em culturas, bem como no processo de maturação dos oligodendrócitos e produção de mielina. Além disso, o G1 pode ser capaz de acelerar o processo de remielinização em ratos após indução de desmielinização por tratamento químico e que a bainha de mielina produzida é mais espessa (33).

O GPER está relacionado a mecanismos anti-inflamatórios e neuroprotetores do estrogênio (103, 104). Foi demonstrado que o G-1, compete pela ligação com o 17β -

estradiol e altera o padrão da produção de citocinas, levando a uma diminuição na produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6 e IL-12 em culturas de macrófagos de linhagem humana ou murina estimuladas com LPS e de IL-17 e IFN- γ em cultura de linfócitos T (105). A ativação deste receptor também foi capaz de reduzir o processo inflamatório na medula espinhal de camundongos com EAE e diminuir a infiltração de macrófagos no sistema nervoso central. Embora o tratamento com G1 não tenha sido capaz de evitar a incidência da EAE, o aparecimento da doença foi tardio e o escore clínico foi menor (102).

Inúmeras pesquisas já comprovaram o papel anti-inflamatório do E2, porém pouco ainda se sabe sobre sua ação através do receptor GPER, especialmente no modelo de EAE. Tendo em vista isso, assim como o papel que os astrócitos desempenham na patologia da doença, é importante compreender se a ativação do GPER em astrócitos poderia ser protetora e, conseqüentemente, ser um alvo terapêutico.

2 Conclusão

A astrogliose reativa é caracterizada pela proliferação e hipertrofia dos astrócitos em resposta a uma variedade de insultos ao sistema nervoso central. Essas alterações não são apenas um mecanismo compensatório destinados a proteger metabolicamente os neurônios frente a insultos, mas também uma característica presente em doenças neuro-inflamatórias e neurodegenerativas, tendo como finalidade a redução da inflamação crônica.

O estrógeno é amplamente descrito na literatura por seu papel anti-inflamatório pelas suas ações via receptores nucleares, e mais recentemente, o agonista seletivo de GPER, também mostra alguns efeitos promissores. A astrogliose causada pelo G1, bem como a diminuição do escore clínico da doença são indícios dessa ação anti-inflamatória.

Cada célula responde de modo diferente aos mesmos estímulos e ainda se faz necessário elucidar mais detalhadamente as vias de sinalização envolvidas no processo de ativação do GPER nos astrócitos.

A compreensão dos efeitos anti-inflamatórios e a adaptação dos astrócitos frente a esses insultos pode fornecer ferramentas farmacológicas capazes de modular a reatividade local dessas células e a busca de novos tratamentos para muitas doenças.

REFERÊNCIAS*

1. Lassmann H, Bruck W, Lucchinetti CF. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol.* 2007;17(2):210-8.
2. Milo R, Kahana E. Multiple sclerosis: geoepidemiology, genetics and the environment. *Autoimmun Rev.* 2010;9(5):A387-94.
3. Sadovnick AD. European Charcot Foundation Lecture: the natural history of multiple sclerosis and gender. *J Neurol Sci.* 2009;286(1-2):1-5.
4. Organization WH. Atlas: multiple sclerosis resources in the world 2008. Geneva, Switzerland.: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data; 2008. p. 51.
5. Múltipla ABdE. Atlas da EM 2013. Mapeamento da Esclerose Múltipla no mundo: ABEM; 2013.
6. Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: Noninfectious factors. *Ann Neurol.* 2007;61(6):504-13.
7. Makris A, Piperopoulos A, Karmanioliou I. Multiple sclerosis: basic knowledge and new insights in perioperative management. *J Anesth.* 2014;28(2):267-78.
8. Kurtzke JF. Epidemiology and etiology of multiple sclerosis. *Phys Med Rehabil Clin N Am.* 2005;16(2):327-49.
9. Rosati G. The prevalence of multiple sclerosis in the world: an update. *Neurol Sci.* 2001;22(2):117-39.
10. Lang HL, Jacobsen H, Ikemizu S, Andersson C, Harlos K, Madsen L, et al. A functional and structural basis for TCR cross-reactivity in multiple sclerosis. *Nat Immunol.* 2002;3(10):940-3.
11. Santiago O, Gutierrez J, Sorlozano A, de Dios Luna J, Villegas E, Fernandez O. Relation between Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: analytic study of scientific production. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2010;29(7):857-66.
12. Hawkes CH. Smoking is a risk factor for multiple sclerosis: a metanalysis. *Mult Scler.* 2007;13(5):610-5.
13. Pierrot-Deseilligny C. Clinical implications of a possible role of vitamin D in multiple sclerosis. *J Neurol.* 2009;256(9):1468-79.
14. International Multiple Sclerosis Genetics C, Wellcome Trust Case Control C, Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CC, et al. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature.* 2011;476(7359):214-9.
15. Manson SC, Palace J, Frank JA, Matthews PM. Loss of interhemispheric inhibition in patients with multiple sclerosis is related to corpus callosum atrophy. *Exp Brain Res.* 2006;174(4):728-33.
16. Olek MJ. Multiple sclerosis--Part I. Overview, pathophysiology, diagnostic evaluation, and clinical parameters. *J Am Osteopath Assoc.* 1999;99(11):574-88.
17. Stuve O, Kieseier BC, Hemmer B, Hartung HP, Awad A, Frohman EM, et al. Translational research in neurology and neuroscience 2010: multiple sclerosis. *Arch Neurol.* 2010;67(11):1307-15.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

18. Truini A, Barbanti P, Pozzilli C, Cruccu G. A mechanism-based classification of pain in multiple sclerosis. *J Neurol*. 2013;260(2):351-67.
19. Trapp BD, Nave KA. Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder? *Annu Rev Neurosci*. 2008;31:247-69.
20. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2000;343(13):938-52.
21. Loma I, Heyman R. Multiple sclerosis: pathogenesis and treatment. *Curr Neuroparmacol*. 2011;9(3):409-16.
22. Miller DH, Barkhof F, Frank JA, Parker GJ, Thompson AJ. Measurement of atrophy in multiple sclerosis: pathological basis, methodological aspects and clinical relevance. *Brain*. 2002;125(Pt 8):1676-95.
23. Rivera-Quinones C, McGavern D, Schmelzer JD, Hunter SF, Low PA, Rodriguez M. Absence of neurological deficits following extensive demyelination in a class I-deficient murine model of multiple sclerosis. *Nat Med*. 1998;4(2):187-93.
24. Zamvil SS, Steinman L. Diverse targets for intervention during inflammatory and neurodegenerative phases of multiple sclerosis. *Neuron*. 2003;38(5):685-8.
25. Gold R, Linington C, Lassmann H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain*. 2006;129(Pt 8):1953-71.
26. Rangachari M, Kuchroo VK. Using EAE to better understand principles of immune function and autoimmune pathology. *J Autoimmun*. 2013;45:31-9.
27. Domingues HS, Mues M, Lassmann H, Wekerle H, Krishnamoorthy G. Functional and pathogenic differences of Th1 and Th17 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS One*. 2010;5(11):e15531.
28. Iglesias A, Bauer J, Litzenburger T, Schubart A, Linington C. T- and B-cell responses to myelin oligodendrocyte glycoprotein in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Glia*. 2001;36(2):220-34.
29. Hofstetter HH, Shive CL, Forsthuber TG. Pertussis toxin modulates the immune response to neuroantigens injected in incomplete Freund's adjuvant: induction of Th1 cells and experimental autoimmune encephalomyelitis in the presence of high frequencies of Th2 cells. *J Immunol*. 2002;169(1):117-25.
30. Sriram S, Steiner I. Experimental allergic encephalomyelitis: a misleading model of multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2005;58(6):939-45.
31. Tsuneya Ikeku HG. *Neuroimmune Pharmacology* 2008.
32. Naftel JP, Ard MD, Fratkin JD, Hutchins JB. *Fundamental Neuroscience for basic and clinical applications*. 3rd ed. Philadelphia: Elsevier; 2006.
33. Hirahara Y, Matsuda KI, Yamada H, Saitou A, Morisaki S, Takanami K, et al. G protein-coupled receptor 30 contributes to improved remyelination after cuprizone-induced demyelination. *Glia*. 2013;61(3):420-31.
34. Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*. 1996;19(8):312-8.
35. He F, Sun YE. Glial cells more than support cells? *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(4):661-5.
36. Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci*. 2003;26(10):523-30.
37. Dong Y, Benveniste EN. Immune function of astrocytes. *Glia*. 2001;36(2):180-90.

38. Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci.* 2006;7(1):41-53.
39. Nakayama T, Momoki-Soga T, Inoue N. Astrocyte-derived factors instruct differentiation of embryonic stem cells into neurons. *Neurosci Res.* 2003;46(2):241-9.
40. Iglesias J, Morales L, Barreto GE. Metabolic and Inflammatory Adaptation of Reactive Astrocytes: Role of PPARs. *Mol Neurobiol.* 2016.
41. Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Ishigame H, Kakuta S, et al. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2006;177(1):566-73.
42. Ransohoff RM, Kivisakk P, Kidd G. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(7):569-81.
43. Gimenez MA, Sim JE, Russell JH. TNFR1-dependent VCAM-1 expression by astrocytes exposes the CNS to destructive inflammation. *J Neuroimmunol.* 2004;151(1-2):116-25.
44. Nair A, Frederick TJ, Miller SD. Astrocytes in multiple sclerosis: a product of their environment. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65(17):2702-20.
45. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature.* 2006;441(7090):235-8.
46. Crawford DK, Mangiardi M, Song B, Patel R, Du S, Sofroniew MV, et al. Oestrogen receptor beta ligand: a novel treatment to enhance endogenous functional remyelination. *Brain.* 2010;133(10):2999-3016.
47. Callegaro D, Goldbaum M, Morais L, Tilbery CP, Moreira MA, Gabbai AA, et al. The prevalence of multiple sclerosis in the city of Sao Paulo, Brazil, 1997. *Acta Neurol Scand.* 2001;104(4):208-13.
48. Sharma R, Fischer MT, Bauer J, Felts PA, Smith KJ, Misu T, et al. Inflammation induced by innate immunity in the central nervous system leads to primary astrocyte dysfunction followed by demyelination. *Acta Neuropathol.* 2010;120(2):223-36.
49. Abbas AK. Immunological tolerance. *Cellular and Molecular Immunology: Elsevier Health Sciences;* 2009. p. 252-3.
50. Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med.* 2004;199(7):971-9.
51. Engelhardt B, Ransohoff RM. The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. *Trends Immunol.* 2005;26(9):485-95.
52. Gandhi R, Laroni A, Weiner HL. Role of the innate immune system in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2010;221(1-2):7-14.
53. Flugel A, Berkowicz T, Ritter T, Labeur M, Jenne DE, Li Z, et al. Migratory activity and functional changes of green fluorescent effector cells before and during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunity.* 2001;14(5):547-60.
54. Constantin G, Laudanna C, Brocke S, Butcher EC. Inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis by a tyrosine kinase inhibitor. *J Immunol.* 1999;162(2):1144-9.

55. Kieseier BC, Kiefer R, Clements JM, Miller K, Wells GM, Schweitzer T, et al. Matrix metalloproteinase-9 and -7 are regulated in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain*. 1998;121 (Pt 1):159-66.
56. Goverman J. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(6):393-407.
57. Vartanian T, Li Y, Zhao M, Stefansson K. Interferon-gamma-induced oligodendrocyte cell death: implications for the pathogenesis of multiple sclerosis. *Mol Med*. 1995;1(7):732-43.
58. Waxman SG. Demyelinating diseases--new pathological insights, new therapeutic targets. *N Engl J Med*. 1998;338(5):323-5.
59. Steinman L. Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. *Cell*. 1996;85(3):299-302.
60. Ozawa K, Suchanek G, Breitschopf H, Bruck W, Budka H, Jellinger K, et al. Patterns of oligodendroglia pathology in multiple sclerosis. *Brain*. 1994;117 (Pt 6):1311-22.
61. Neumann H, Medana IM, Bauer J, Lassmann H. Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases. *Trends Neurosci*. 2002;25(6):313-9.
62. Bachmann R, Eugster HP, Frei K, Fontana A, Lassmann H. Impairment of TNF-receptor-1 signaling but not fas signaling diminishes T-cell apoptosis in myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide-induced chronic demyelinating autoimmune encephalomyelitis in mice. *Am J Pathol*. 1999;154(5):1417-22.
63. Zettl UK, Gold R, Toyka KV, Hartung HP. In situ demonstration of T cell activation and elimination in the peripheral nervous system during experimental autoimmune neuritis in the Lewis rat. *Acta Neuropathol*. 1996;91(4):360-7.
64. Nguyen KB, McCombe PA, Pender MP. Macrophage apoptosis in the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Autoimmun*. 1994;7(2):145-52.
65. Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. A quantitative analysis of oligodendrocytes in multiple sclerosis lesions. A study of 113 cases. *Brain*. 1999;122 (Pt 12):2279-95.
66. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet*. 2008;372(9648):1502-17.
67. Tsang BK, Macdonell R. Multiple sclerosis- diagnosis, management and prognosis. *Aust Fam Physician*. 2011;40(12):948-55.
68. Harrison DM, Gladstone DE, Hammond E, Cheng J, Jones RJ, Brodsky RA, et al. Treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis with high-dose cyclophosphamide induction followed by glatiramer acetate maintenance. *Mult Scler*. 2012;18(2):202-9.
69. Storch MK, Stefferl A, Brehm U, Weissert R, Wallstrom E, Kerschensteiner M, et al. Autoimmunity to myelin oligodendrocyte glycoprotein in rats mimics the spectrum of multiple sclerosis pathology. *Brain Pathol*. 1998;8(4):681-94.
70. Gay FW, Drye TJ, Dick GW, Esiri MM. The application of multifactorial cluster analysis in the staging of plaques in early multiple sclerosis. Identification and characterization of the primary demyelinating lesion. *Brain*. 1997;120 (Pt 8):1461-83.
71. Kipp M, Beyer C. Impact of sex steroids on neuroinflammatory processes and experimental multiple sclerosis. *Front Neuroendocrinol*. 2009;30(2):188-200.

72. Fish EN. The X-files in immunity: sex-based differences predispose immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(9):737-44.
73. Damek DM, Shuster EA. Pregnancy and multiple sclerosis. *Mayo Clin Proc*. 1997;72(10):977-89.
74. Voskuhl RR, Gold SM. Sex-related factors in multiple sclerosis susceptibility and progression. *Nat Rev Neurol*. 2012;8(5):255-63.
75. Avellar MCW. Estrógenos e progestógenos. In: De Lucia R, Oliveira-Filho RM, editors. *Farmacologia Integrada*: Revinter; 2007. p. 619.
76. Brann DW, Dhandapani K, Wakade C, Mahesh VB, Khan MM. Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogen: basic mechanisms and clinical implications. *Steroids*. 2007;72(5):381-405.
77. McEwen B. Estrogen actions throughout the brain. *Recent Prog Horm Res*. 2002;57:357-84.
78. Takao T, Flint N, Lee L, Ying X, Merrill J, Chandross KJ. 17beta-estradiol protects oligodendrocytes from cytotoxicity induced cell death. *J Neurochem*. 2004;89(3):660-73.
79. Levin ER. Nuclear receptor versus plasma membrane oestrogen receptor. *Novartis Found Symp*. 2000;230:41-50; discussion -5.
80. Enmark E, Gustafsson JA. Oestrogen receptors - an overview. *J Intern Med*. 1999;246(2):133-8.
81. Platania P, Laureanti F, Bellomo M, Giuffrida R, Giuffrida-Stella AM, Catania MV, et al. Differential expression of estrogen receptors alpha and beta in the spinal cord during postnatal development: localization in glial cells. *Neuroendocrinology*. 2003;77(5):334-40.
82. Kuo J, Hamid N, Bondar G, Prossnitz ER, Micevych P. Membrane estrogen receptors stimulate intracellular calcium release and progesterone synthesis in hypothalamic astrocytes. *J Neurosci*. 2010;30(39):12950-7.
83. Bouman A, Heineman MJ, Faas MM. Sex hormones and the immune response in humans. *Hum Reprod Update*. 2005;11(4):411-23.
84. Arruvito L, Sanz M, Banham AH, Fainboim L. Expansion of CD4+CD25+and FOXP3+ regulatory T cells during the follicular phase of the menstrual cycle: implications for human reproduction. *J Immunol*. 2007;178(4):2572-8.
85. Gilmore W, Weiner LP, Correale J. Effect of estradiol on cytokine secretion by proteolipid protein-specific T cell clones isolated from multiple sclerosis patients and normal control subjects. *J Immunol*. 1997;158(1):446-51.
86. Pernis AB. Estrogen and CD4+ T cells. *Curr Opin Rheumatol*. 2007;19(5):414-20.
87. Haghmorad D, Amini AA, Mahmoudi MB, Rastin M, Hosseini M, Mahmoudi M. Pregnancy level of estrogen attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis in both ovariectomized and pregnant C57BL/6 mice through expansion of Treg and Th2 cells. *J Neuroimmunol*. 2014;277(1-2):85-95.
88. McClain MA, Gatson NN, Powell ND, Papenfuss TL, Gienapp IE, Song F, et al. Pregnancy suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis through immunoregulatory cytokine production. *J Immunol*. 2007;179(12):8146-52.
89. Tyagi AM, Srivastava K, Mansoori MN, Trivedi R, Chattopadhyay N, Singh D. Estrogen deficiency induces the differentiation of IL-17 secreting Th17 cells: a new candidate in the pathogenesis of osteoporosis. *PLoS One*. 2012;7(9):e44552.

90. Mo R, Chen J, Grolleau-Julius A, Murphy HS, Richardson BC, Yung RL. Estrogen regulates CCR gene expression and function in T lymphocytes. *J Immunol.* 2005;174(10):6023-9.
91. Kramer PR, Winger V, Kramer SF. 17beta-Estradiol utilizes the estrogen receptor to regulate CD16 expression in monocytes. *Mol Cell Endocrinol.* 2007;279(1-2):16-25.
92. Murphy AC, Lalor SJ, Lynch MA, Mills KH. Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Behav Immun.* 2010;24(4):641-51.
93. Spence RD, Wisdom AJ, Cao Y, Hill HM, Mongerson CR, Stapornkul B, et al. Estrogen mediates neuroprotection and anti-inflammatory effects during EAE through ERalpha signaling on astrocytes but not through ERbeta signaling on astrocytes or neurons. *J Neurosci.* 2013;33(26):10924-33.
94. Tiwari-Woodruff S, Morales LB, Lee R, Voskuhl RR. Differential neuroprotective and antiinflammatory effects of estrogen receptor (ER)alpha and ERbeta ligand treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(37):14813-8.
95. Lelu K, Laffont S, Delpy L, Paulet PE, Perinat T, Tschanz SA, et al. Estrogen receptor alpha signaling in T lymphocytes is required for estradiol-mediated inhibition of Th1 and Th17 cell differentiation and protection against experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2011;187(5):2386-93.
96. Wisdom AJ, Cao Y, Itoh N, Spence RD, Voskuhl RR. Estrogen receptor-beta ligand treatment after disease onset is neuroprotective in the multiple sclerosis model. *J Neurosci Res.* 2013;91(7):901-8.
97. Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science.* 2005;307(5715):1625-30.
98. Thomas P, Pang Y, Filardo EJ, Dong J. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology.* 2005;146(2):624-32.
99. Micevych P, Sinchak K. Synthesis and function of hypothalamic neuroprogesterone in reproduction. *Endocrinology.* 2008;149(6):2739-42.
100. Filardo EJ, Thomas P. Minireview: G protein-coupled estrogen receptor-1, GPER-1: its mechanism of action and role in female reproductive cancer, renal and vascular physiology. *Endocrinology.* 2012;153(7):2953-62.
101. Bruno A, Aiello F, Costantino G, Radi M. Homology Modeling, Validation and Dynamics of the G Protein-coupled Estrogen Receptor 1 (GPER-1). *Mol Inform.* 2016;35(8-9):333-9.
102. Blasko E, Haskell CA, Leung S, Gualtieri G, Halks-Miller M, Mahmoudi M, et al. Beneficial role of the GPR30 agonist G-1 in an animal model of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2009;214(1-2):67-77.
103. Ruiz-Palmero I, Hernando M, Garcia-Segura LM, Arevalo MA. G protein-coupled estrogen receptor is required for the neuritogenic mechanism of 17beta-estradiol in developing hippocampal neurons. *Mol Cell Endocrinol.* 2013;372(1-2):105-15.

104. Yates MA, Li Y, Chlebeck PJ, Offner H. GPR30, but not estrogen receptor-alpha, is crucial in the treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral ethinyl estradiol. *BMC Immunol.* 2010;11:20.
105. Bologa CG, Revankar CM, Young SM, Edwards BS, Arterburn JB, Kiselyov AS, et al. Virtual and biomolecular screening converge on a selective agonist for GPR30. *Nat Chem Biol.* 2006;2(4):207-12.