Wesley Nogueira Brandão

Relação entre o padrão de citocinas secretadas por células da microglia ativadas *in vitro* e a geração de células T

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Alergia e Imunopatologia Orientador: Prof. Dr. Luiz Vicente Rizzo.

São Paulo

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

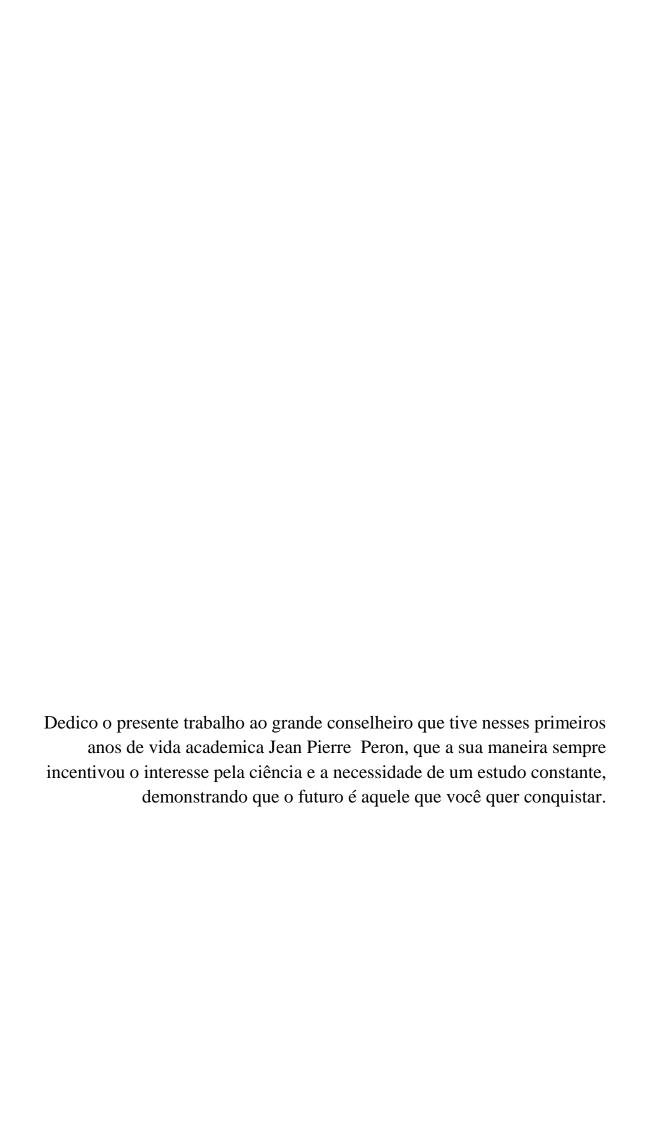
Brandão, Wesley Nogueira

Relação entre o padrão de citocinas secretadas por células da microglia ativadas *in vitro* e a geração de células T / Wesley Nogueira Brandão. -- São Paulo, 2013. Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Alergia e Imunopatologia.

Orientador: Luiz Vicente Rizzo.

Descritores: 1.Microglia 2.Indoleamina 2,3 dioxigenase 3.Linfócitos T 4.Proliferação de células 5.Células Th17 6.Encefalomielite autoimune experimental

USP/FM/DBD-104/13



AGRADECIMENTOS

Aos meus pais que sempre me incentivaram a perseguir o sonho desejado sem reclamar das tribulações.

Ao Prof. Dr. Luiz Vicente Rizzo, que além de acreditar, me deu a oportunidade de mostrar que este trabalho poderia ser realizado.

Ao Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara, pelos diversos conselhos e por manter as portas de seu laboratório sempre abertas.

Aos amigos de convívio: Bruno Sini e Natalia Moreira Santos, que sempre propuseram as melhores e mais diversificadas conversas ciêntificas que pude ter o prazer de participar.

Aos meus amigos que nesses anos trabalharam ao meu lado: Andira Finckinger, Daniel Mucida, Cristiano Rossato, Fernando de Sá, Eliana Marengo, Pedro Papoto, Lílian Buzzetto e Luiz Sardinha.

Agradeço imensamente a Ana Carolina Durão, pois sem esta com certeza teria me perdido a lucidez, e em certos pontos a coragem de atravesar mais esta etapa.

Agradeço também as dificuldades encontradas durante o percurso, pois foram estas as que mais contribuiram para o meu amadurecimento.

As agencias de formento, FAPESP e UNIEMP por proporcionar os recursos necessários para o desenvolvimento deste trabalho.

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

SUMÁRIO

Resumo Summary

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Células da microglia	1
1.1.1 Função das Células da Microglia no Desenvolvimento e Reparo do SNC	4
1.2 Papel das Células da Microglia na Neuroinflamação e Neurodegeneração	6
1.3 Esclerose Múltipla	8
1.4 Encefalomielite Auto-imune Experimental	12
1.4.1 As Sub-populações de Células Th1 e Th17 na EAE	12
1.5 Indoleamina-2,3-dioxigenase	18
2. OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo Geral	21
2.2 Objetivos Específicos	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 Animais	22
3.2 Indução de EAE ativa e Tratamento com Pellet de 1-MT	22
3.3 Culturas celular da linhagem de microglia C8-B4	23
3.4 Cultura primária de microglia	24
3.5 Ensaio de proliferação in vitro e in vivo de linfócitos CD4+ específicos para MOG35-55	25
3.6 Imunofluorescência	27
3.7 Real Time PCR	28

3.8 Citometria de fluxo	31
3.9 Análise Estatística	32
3.10 Comitê de Ética	32
4 RESULTADOS	33
4.1 Linhagem de Células da Microglia C8-B4	33
4.1.1 Expressão de Citocinas e TLRs	35
4.1.2 Avaliação da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase - IDO	38
4.2. Cultura Primária das Células da Microglia	40
4.2.1 Expressão de Genes para Citocinas	43
4.3 Avaliação da Expressão de IDO em Culturas Primárias de Células da Microglia	45
4.3.1 Avaliação Funcional	47
4.4 Inibição da IDO in vivo Exacerba a Encefalomielite Experimental Auto-imune	49
4.4.1 Presença da IDO no SNC	50
4.4.2 Células CD4 2D2 Específicas para MOG35-55 Proliferam no SNC	52
5. DISCUSSÃO	54
6. CONCLUSÕES	65
7. REFERÊNCIAS	66

RESUMO

Brandão WN. Relação entre o padrão de citocinas secretadas por células da microglia ativadas *in vitro* e a geração de células T. [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

INTRODUÇÃO: Atualmente as células da microglia têm recebido grande atenção dentro da resposta imune, isto devido ao fato de que sua ativação por citocinas inflamatórias é capaz de promover a infiltração e destruição do sistema nervoso central (SNC) durante algumas doenças, principalmente no caso da esclerose múltipla (EM). Além de seu papel pró-inflamatório, já demonstrou-se que estas também são capazes de expressar moléculas supressoras como a indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO), capaz de suprimir a proliferação de células T. Contudo, ainda pouco se sabe sobre seu verdadeiro papel na patogenia da EM. Recentemente tem sido descrita uma população de células T chamadas Th17, capaz de secretar grandes quantidades de IL-17, IL-21 e GM-CSF possuindo uma importância fundamental na patogenia da EM e de seu modelo murino, a EAE. Nesse contexto, a relação entre as Th17 e as células da microglia pode nos fornecer dados importantes acerca dos mecanismos envolvidos nas lesões observadas no SNC. OBJETIVO: Este trabalho teve como objetivo melhor elucidar a relação existente entre a expressão das moléculas imunes por células da microglia e a ação que estas promovem sobre as células T. MÉTODOS: Utilizamos culturas de células da microglia de linhagem, chamadas C8-B4, assim como cultura primária de células da microglia obtidas a partir sistema nervoso de camundongos C57BL/6 adultos. Caracterizamos o perfil imune da microglia, avaliando a transcrição de genes para citocinas através de PCR em tempo real assim como a expressão de suas moléculas ativadoras por citometria de fluxo. A avaliação da IDO se deu através da expressão da mesma por células da microglia ativadas ou não por LPS ou IFN-γ. Ja sua capacidade funcional foi medida através da atividade proliferativa de linfócitos T CD4 específicos para MOG 35-55. RESULTADOS: Nossos resultados demonstraram que as células de ambas as culturas possuem a capacidade de expressar diversas moléculas imunes, tanto pró quanto anti-inflamatórios. Dentre estas observamos TLR-4, TLR-2, IL-6, IL-10 e TGFβ. Além disso, confirmamos a expressão da enzima IDO por estas células. O bloqueio de tal enzima impede o controle que a microglia tem sobre a proliferação dos linfócitos T CD4, tanto in vitro quanto in vivo. No modelo in vivo tal efeito repercute em uma encefalomilite mais severa, onde o quadro clínico do animal não regride. CONCLUSÃO: Os resultados aqui obtidos nos dão a certeza da influência das microglias dentro do contexto inflamatório, afirmando sua capacidade de modular a resposta imune. Além disto, fica clara a importância da enzima IDO, cuja ação dentro do controle de uma autoimunidade demonstra ser altamente necessária.

Descritores: 1.Microglia 2.Indoleamina 2,3 dioxigenase 3.Linfócitos T 4.Proliferação de células 5.Células Th17 6.Encefalomielite autoimune experimental

ABSTRACT

Brandão WN. Relationship between the pattern of cytokines secreted by microglia cells activated in vitro and T cell generation [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

INTRODUCTION: Microglia cells has gained great attention recently because its activation by inflammatory cytokines can promote infiltration and destruction of Central Nervous System (CNS) during some disease, mainly in the case of Multiple Sclerosis (MS). On the other hand, these cells may also express suppressor molecules such as the indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO), able to suppress T cell proliferation. However, still little is known about its role in MS pathogenesis. Recently it has been described a new population of T cells called Th17, able to secrete high amounts of IL-17, IL-21 and GM-CSF, with a fundamental importance on MS and its murine model, EAE. In this context, the relationship between Th17 and microglia cells can provide us important data about the mechanisms involved in the establishment of CNS lesions. OBJECTIVES: This work had the objective to better elucidate the relationship between the expression of some molecules by microglia and its role T cell activation. METHODS: Through a cellular lineage knowing as C8-B4 and primary cultures of microglia obtained from CNS of adult mice C57BL6 we investigated the transcription of several genes for cytokines and membrane expression of several pattern recognition receptors. The IDO evaluation was performed after activation with LPS or rIFN-y. Its functional capacity was measured trough its action over T cell proliferation. RESULTS: Our results demonstrated that both cells have the capacity of express several immune molecules, both pro and anti-inflammatory. Among this, we observed TLR-4, TLR-2, IL-6, IL-10 and TGF-β. We also confirmed IDO expression by these cells. The blockade of such enzyme prevents the control of microglia above T CD4 lymphocytes proliferation, both in vitro and in vivo. Using the in vivo model, IDO blocker rendered a encephalomyelitis more severe. Conclusion: The results here obtained give us the certainty of microglia influence in inflammatory context, stating its capacity of modulating the immune response.

Descriptors: 1.Microglia 2.Indoleamine 2,3 dioxygenase 3.T Linfocyte 4.Cells Proliferation 5.Th17 Cells 6. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis

1 INTRODUÇÃO

1.1 Células da microglia

As células da microglia são amplamente encontradas no sistema nervoso central (SNC) e suas características se assemelham muito àquelas de macrófagos. De fato, acredita-se que aquelas representem os equivalentes teciduais dessa população, sendo encontradas numa frequência entre 5-15% das células do cérebro adulto (Monier et al., 2006). Todavia, apesar das semelhanças entre as células da microglia e os macrófagos, é sabido que tais populações diferem tanto em expressão gênica, como em função e origem. Anteriormente acreditava-se que as células da microglia derivassem de precursores mielóides comuns provenientes da medula óssea, que expressam o marcador PU.1. Corroborando tal hipótese, animais deficientes para PU.1 são desprovidos não só de células da microglia, como também de macrófagos periféricos (Beers et al., 2006; McKercher et al., 1996). Transferência de medula óssea para esses animais foi capaz de restabelecer tais populações, levando à interpretação errônea que de fato as células da microglia são derivadas da medula óssea (Beers et al., 2006). Estudos mais recentes utilizando animais CX₃CR₁- GFP e Runx1 – Cre provaram que tal população na verdade deriva de progenitores presentes no saco vitelínico a partir do dia 9.5 de gestação. Mais interessante, ao dia 10, essas células já são encontradas no sistema nervoso, assim que o sistema circulatório é estabelecido. Logo, hoje é aceito que as células da microglia são derivadas de progenitores hematopoiéticos comuns porém provenientes do saco vitelínico, que posteriormente ocupam o sistema nervoso de forma independente da medula óssea (Ginhoux et al., 2010).

Por outro lado, se durante a vida adulta tal população sofre auto-renovação in situ ou se depende do recrutamento de progenitores da medula óssea ainda é motivo de debate. É sabido, porém, que durante doenças neuroinflamatórias emigrantes do sangue periférico são amplamente encontrados no parênquima cerebral. Morfologicamente as células da microglia tem por característica muitos prolongamento, com um corpo celular e núcleo pequenos. Funcionalmente, possuem baixa ou nula expressão de móleculas de MHC I e II, assim como de moléculas co-estimulatórias. Estas se relacionam com a dinâmica do SNC, auxiliando não só no desenvolvimento da arquitetura cerebral, mas também na manutenção da homesotasia deste perante possíveis sinais de infecção (Czeh et al., 2011). Dentre os fatores que mantém esse estado quiescente das células da microglia está a grande quantidade de proteínas imunomoduladoras presentes nos fluídos intersticiais. Dentre estas, podermos citar o TGF-β (do inglês Transforming Growth Factor- β), a prostaglandina E2 (PGE₂) e o M-CSF (do inglês Macrophage Colony-stimulating Factor), responsáveis pela downregulation da expressão de moléculas ativadoras como CD80, CD86 , CD40 e MHC II, atuando assim na manutenção da supressão desse grupo celular (Ponomarev et al., 2005a). Em um trabalho mais recente, o mesmo autor demonstrou que tal fenômeno é orquestrado também pela presença do miRNA-124. Este em grandes quantidades é capaz de suprimir a transcrição de genes como àqueles do MHC e também do TNF-α. Durante a ativação destas células por LPS ocorre a inibição do fator de transcrição C/EBP-α (do inglês, CCAAT/enhancer-binding protein-α) e diminuição dos níveis de miRNA-124, culminando no aumento da expressão de MHC II (Ponomarev et al., 2011). Além do LPS demais estímulos podem desencadear a ativação da microglia, seja por estimulação dos demais TLRs (do inglês, Toll-like receptors) ou através da ação de citocinas e fatores neuroativadores.

Dentre estes fatores, temos o ATP liberado após a morte neuronal, que atua através dos receptores ionotrópicos purinérgicos P2X e metabotrópicos P2Y promovendo o aumento da capacidade de fagocitose das células da microglia (Davalos et al., 2005; Koizumi et al., 2007). Além destes, há também a ação do glutamato, um neurotransmissor excitatório que em excesso se torna neurotóxico. A resposta a este neurotransmissor ocorre de maneira similar àquela ao ATP, através de dois tipos de receptores específicos: receptores ionotrópicos (NMDA, AMPA e Kainato) e os receptores metabotrópicos (mGluRs 1-8) (Pin; Duvoisin, 2005). A ativação dos receptores mGluR presentes em células da microglia pode resultar em neuroproteção, como no caso do mGlur do grupo III (mGlur 4-8), que diminui a resposta das células da microglia perante estímulos pró-inflamatórios como o LPS e a proteína β-amilóide, encontrada em depósitos no cérebro de indivíduos com Alzheimer (Taylor et al., 2003). Mais interessante, as células da microglia também podem ser uma fonte importante de glutamato, uma vez que a ativação por LPS ou TNF-α induz secreção de de altos níveis de glutamato, o que repercute em um aumento da neurotoxicidade e consequentemente da morte neuronal por excitotoxicidade (Shijie et al., 2009; Floden et al., 2005).

Haja vista que as células da microglia estão em contato frequente com as células do SNC, é passível de se imaginar que tais interações são importantes na modulação destas células. De fato é descrito que as interações célula-célula em que se há a ativação por meio de moléculas de contato (CD200-CD200R / CD172a-CD47 / TREM2-TREM2-L) acaba por resultar no aumento da fosforilação dos ITAMs (do inglês *Immunereceptor Tyrosine Activator Motif*) ou dos ITIMs (do inglês *Immunereceptor Tyrosine Inhibitory Motif*), provocando alterações na morfologia celular, capacidade fagocitica, expressão de móleculas co-estimuladoras, MHC II, assim como na síntese de citocinas e

quimiocinas. (Ransohoff; Perry, 2009; Hsieh et al., 2009). Esta ativação pode ser derivada de sinais agudos ou crônicos como stress, infecção, inflamação e sinais de dano neuronal. A variação de tais fatores é que irá determinar o papel destas células, seja durante o estado fisiológico ou no decorrer de uma patologia (Graeber; Streit, 2010)

1.1.1 Função das Células da Microglia no Desenvolvimento e Reparo do SNC

Fisiologicamente a microglia atua em diversas fases do desenvolvimento cerebral, principalmente através da fagocitose de células mortas, regulação da proliferação celular, diferenciação neuronal e angiogênese (Tremblay et al., 2011). É descrito que a partir da 16-22ª semana de gestação, já são observadas quimiocinas de monócitos (MIP-1α) na camada superior do córtex cerebral humano (Czeh et al., 2011). Ainda mais interessante é o fato de que nesse período as células da microglia já possuem funcionalidade completa, com capacidade de responder e secretar citocinas próinflamatóras, espécies reativas do oxigênio e enzimas proteolíticas, podendo assim atuar de maneira ativa na estruturação do SNC. Colaborando com estas afirmações Pang et al (2010), demonstrou que células da microglia de camundongos neonatos ao se tornarem ativas adquirem a capacidade de modular a sobrevivência de oligodendrócitos, seja através da indução de apoptose ou por diminuição de seus fatores de crescimento, auxiliando assim no direcionamento do isolamento axonal.

Durante as primeiras semanas de desenvolvimento pós-natal são descritos sinais de intensa plasticidade, com novas sinapses sendo ativamente formadas e remodeladas. Nesse período os neurônios fazem muito mais conexões sinápticas do que seriam nescessárias para a manutenção do SNC. Á partir de uma atividade de desenvolvimento denominada poda sináptica, um grande número dessas sinapses imaturas são permanentemente eliminadas, enquanto que o subconjunto restante são mantidas e

reforçadas (Ransohoff; Perry, 2009). Evidências indicam a microglia como peça-chave nesse processo de poda sináptica. Tal fenômeno é observado em várias regiões distintas do cérebro durante a remodelação sináptica pós-natal, incluindo o cerebelo, tálamo, bulbo olfatório e hipocampo (Tremblay et al., 2010).

Em 2009 Wake et al. demonstrou uma atuação direta da microglia sobre a sinapse neural. Através de análises por microscopia de dois fótons e imunofluorescência o autor revela que as células da microglia mantém contato direto com as regiões de pré e póssinapse sugerindo atuação direta dessas células com os neurônios. Mais interessante, durante uma injúria no SNC promovida por isquemia, o tempo de contato entre as células da microglia e neurônios esta aumentado. Tal fenômeno pode estar relacionado com a variação de sinais quimio-atrativos / repelentes. Dentre os sinais atrativos são sugeridos o ATP, o glutamato, fatores de crescimento e quimiocinas aos quais as células da microglia possuem receptores, promoveriam mudanças do estado quiescente para o de ativação dessas células. Essa mudança pode influenciar principalmente na recuperação do sistema nervoso após uma lesão, como no caso de axotomia, em que animais deficientes para MHC classe I possuem maior perda axonal (Wake et al., 2009). Já estudos com animais deficientes de CX3CR1 mostra uma redução significativa na densidade de microglia no período pós-natal apresentando defeitos transitórios da conectividade sináptica e plasticidade na região do hipocampo (Paolicelli et al., 2011).

Com o passar do tempo o perfil de citocinas junto às demais propriedades da microglia se alteraram. De seu perfil regulador passam a adquirir características pró-inflamatórias, com aumento na expressão de moléculas de MHC I e II, CD11b, CD80 e CD86, associado a um aumento na síntese de de IL-1β, IL-6 e TNF-α. Este último tem demonstrado grande influência na homeostase do SNC, não só por ser nescessário para a ativação de fatores neurogênicos (Czeh et al., 2011) como também na resposta à

obesidade (Romanatto et al., 2009). Em contrapartida ao aumento de fatores próinflamatórios é demonstrada a diminuição de citocinas imunossupressoras (IL-10) e fatores de crescimento (Czeh et al., 2011). Tais fenômenos estão sendo cada vez mais relacionados com as neuropatologias, seja pelo aumento nas inflamações em doenças como Parkinson e Alzheimer ou na modulação da resposta imune encontrada na esclerose múltipla.

1.2 Papel das Células da Microglia na Neuroinflamação e Neurodegeneração.

Dentre as doenças em que as células da microglia estão associadas, a Doença de Alzheimer (DA) é uma das mais descritas. Isso porque grande parte da patogenia dessa doença esta relacionada com aumento de oligômeros do peptídeo β-amilóide (Aβ), substância esta capturada em grande parte pela microglia (Hémar; Mulle, 2011). Tornou-se claro que a Aβ interrompe a função sináptica glutamatérgica, que por sua vez pode levar a déficits cognitivos característicos, como sinais de demência, entre outros. Muitos estudos têm tentado determinar os mecanismos pelos quais Aβ interrompe a plasticidade sináptica e mediar seus efeitos prejudiciais, no entanto mais estudos são necessários para melhor elucidar sua ação (Robinson et al., 2011).

Por volta dos últimos 20 anos, estudos começaram a relacionar a resposta imune inata com a DA. Entre os achados se encontram os efeitos dos anti-inflamatórios não esteróides (AINES) os quais auxiliaram na redução do início ou pico da doença (Ransohoff; Perry, 2009). Ainda não se sabe o efeito destes anti-inflamatórios sobre a resposta das células da microglia, contudo grandes variedades de mediadores inflamatórios passam a ser sintetizados nessas células após ativação por Aβ. Além

destes, estudos com animais transgênicos para Aβ demonstraram que a ativação da microglia por LPS reduz o tamanho das placas de Aβ no SNC. Mais interessantes foram os resultados da imunização destes animais com a própria Aβ, a qual resultou num aumanto na taxa de remoção da placa (Ransohoff; Perry, 2009). A partir de tais resultados deu-se início à vacinações em humanos as quais demonstraram que a produção de anticorpos se associa à diminuição do depósito da placa Aβ. Contudo esta diminuição não trouxe vantagens clínicas para estes indivíduos, tanto na sobrevida como no atraso dos sintomas de demência grave (Holmes et al., 2008). Ainda hoje se pesquisa alternativas para o controle da patologia, seja através da modulação da resposta imune das células da microglia, no favorecimento de sua ação fagocítica ou inibindo sua função pró-inflamatória (Rojanathammanee et al. 2013; Yamanaka et al., 2012).

Outra doença que tem relação com as células da microglia é a AIDS (Sindrome da Imunodeficiência Humana Adquirida). Isso devido ao fato de que estas representam um dos principais alvos do HIV-1 no cérebro, desempenhando um papel importante na patogênese dos distúrbios cognitivos associados ao HIV. Ao ser infectada a microglia passa a produzir e liberar diversos fatores neurodegenerativos, tais como espécies reativas de oxigênio, metabólitos do triptofano (ácido quinolínico) e neurotransmissores excitotóxicos entre eles o glutamato. Como mencionado anteriormente o glutamato em grandes quantidades promove dano neuronal por excitotoxicidade, sendo este um dos principais causadores do sintoma da demência em alguns casos de HIV (Huang et al., 2011). Para melhor direcionar a importância deste achado, vale mencionar que no modelo animal símio em que se utiliza o vírus da imunodeficiência símia (SIV), a demência é a causa da morte do animal (Gama, 2011). Outro ponto a se levar em consideração é que através das citocinas secretadas pelas microglias, outras células se

tornam ativadas, como é o caso dos astrócitos. Estes promovem um aumento na síntese de citocinas pró-inflamatórias, além de facilitar a entrada de células do sistema imune para o SNC, aumentando assim os casos de demência. Ainda que não se tenha esclarecido totalmente o papel que as células da microglia desempenha na infecção pelo HIV, as informações obtidas até o momento já servem de base para transpor esses mecanismos para demais doenças neuroinflamatórias.

1.3 Esclerose Múltipla

Dentre as doenças neurodegenerativas, temos como foco principal dos nossos estudos a esclerose múltipla (EM). A EM consiste em uma doença auto-imune que compromete com maior freqüência adultos jovens e de meia idade, com maior incidência e países frios do norte europeu (Oksenberg; Hauser, 2005). A esclerose múltipla é caracterizada por desmielinização progressiva da substância branca, com formação das placas características, decorrente do infiltrado celular local, como avaliado por métodos de ressonância magnética nuclear (RMN). Clinicamente, os sintomas neurológicos em pacientes com EM variam de leve a grave e tipicamente incluem um ou mais dos seguintes sintomas: sintomas sensoriais (formigamento, dormência, distúrbios visuais, tontura), sintomas motores (fraqueza, dificuldade para andar, tremores, problemas intestinais / bexiga, má coordenação e rigidez muscular), e outros sintomas como sensibilidade ao calor, fadiga, alterações emocionais, alterações cognitivas e sintomas sexuais (Bronner et al., 2010).

Atualmente são identificadas três formas clínicas distintas de EM: recorrente/remitente, primária progressiva e secundária progressiva. Dentre essas, a

recorrente/remitente é a mais branda caracterizada por surtos de ataques do sistema imune à bainha de mielina, resultando nos sintomas clínicos da doença intercalados com períodos assintomáticos. Já a forma primária progressiva se enquadra como um dos quadros mais graves, pois desde o primeiro surto há uma progressão constante da doença onde o indivíduo tende a piorar podendo chegar ao óbito. Entre a recorrente/remitente e a primária progressiva se encontra a secundária progressiva. Esta se caracterizada por um surto seguido de remissão; no entanto em determinado momento na vida desses pacientes a doença progride, assumindo as características da primária progressiva (Lima et al., 2008).

A incidência da EM vária dependendo da região, estando mais presente em zonas temperadas. No Brasil calcula-se que a prevalência da doença seja de 10 casos para cada 100 mil habitantes. Já o norte da Europa, norte dos EUA, sul do Canadá, Nova Zelândia e sul da Austrália correspondem as áreas de maior risco com prevalência maior de 30 casos para 100 mil habitantes (ABEM, 2009). Estudos feitos em diferentes regiões do país relatam que dentre a população brasileira a maior prevalência reside na forma recorrente/remitente e em mulheres. Além disso, observou-se uma menor relação entre indivíduos da raça negra, quando comparados aos indivíduos de raça branca e parda (Grzesiuk, 2006; Santos et al., 2007; Ferreira et al., 2004).

Tais diferenças estão associadas às diferentes susceptibilidade que determinados alelos gênicos exercem sobre a EM. Dentre estes os mais destacados são os genes do HLA (do inglês: *Human Leukocyte Antigen*) os quais influenciam diretamente a atividade dos linfócitos T. Até o momento alguns haplótipos apresentam maior propensão ao desenvolvimento da EM, tais como: HLA-DRB5*0101, HLA-

DRB1*1501, HLA-DQA1*0102 e HLA-DQB1*0602, sendo o HLA-DRB1*1501 alelo de maior risco para o desenvolvimento da EM (Oksenberg; Hauser, 2005).

Todavia, a susceptibilidade à EM não reside somente em genes associados ao HLA, genes que codificam outras moléculas também parecem exercer um paperl fundamental. Dentre estes podemos citar IL-2, IL-7, IL-12 e TNF-α, moléculas coestimuladoras como CD40, CD80 e CD86, e de genes relacionados com a transdução dos sinais intracelulares, como a via de Jak-STAT, repercutindo em defeitos na ativação celular, tanto em células da imunidade inata como na ativação, proliferação e diferenciação dos linfócitos. Embora a contribuição individual de cada gene para o desenvolvimento da EM seja modesta, a identificação de tais genes é crítica para o estudo de novos alvos ou abordagens de intervenção terapêutica (Muller et al., 2012).

Em relação às populações celulares envolvidas na patogênese da doença, macrófagos, células dendríticas, linfócitos T e B, e microglia já foram descritas como presentes nos locais de lesão (Chen et al., 2011; Ireland; Monson, 2011; Olah et al., 2011). A ativação da resposta imune se inicia através da ativação de linfócitos T CD4 periféricos à epitopos de mielina. Após ativação e expansão clonal, tais células infiltram o SNC e, após serem ativadas *in* situ por células dendríticas residentes (Bailey et al., 2007) e células da microglia (Ponomarev et al., 2005b), estas passam a secretar uma série de citocinas pró-inflamatórias que induz ativação de astrócitos, células da microglia e células endoteliais, promovendo o processo inflamatório local. Por outro lado, são os macrófagos e os linfócitos T CD8 (Goverman et al., 2005) que aparentemente medeiam as lesões propriamente ditas, através da indução da morte de oligodendrócitos por liberação de espécies reativas do oxigênio, e citocinas como o TNF- α, além de granzimas e perforinas (Muller et al., 2012; Peron et al., 2010). Já os

linfócitos B são as células que mais chamam atenção durante a EM, pois atuam diretamente em várias etapas da resposta imune ao sistema nervoso. Dentre suas ações podemos citar a apresentação de antígenos, liberação de citocinas pró-infamatórias (TNF-α, IL-6, IL-12) e ativação do sistema complemento através de auto-anticorpos. Tais ações influenciam diretamente a resposta de macrófagos e linfócitos aumentando a resposta pró-inflamatória e promovendo um aumento nas lesões do SNC (Krumbholz et al., 2012).

Na tentativa de controlar tais eventos foram desenvolvidos diversos tratamentos os quais atuam em diversos pontos da patologia da EM a fim de impedir os surtos clínicos. Entre os medicamnetos de escolha na clínica temos: Rituximab um anticorpo monoclonal que depleta linfócitos B CD20⁺. O LY2127399, é um anticorpo que atua sobre o BAFF (do inglês: B-cell-activating factor), um importante fator de sobrevivência dos linfócitos B e plasmócitos, impedindo-o de se ligar ao seu receptor (BAFF-R) diminuindo assim os números destas células no sangue. O FTY720 é um medicamento que atua na modulação do receptor S1P (do inglês: sphingosine-1phosphate) impedindo a saída de linfócitos T e B dos órgãos linfóides e consequentemente reduzindo os níveis de células patogências circulantes. Já o Acetato de Glatiramer (Copaxone®), atua modulando a secreção de citocinas pró-inflmatórias, e induzindo a geração de macrófagos M2, células T reguladoras (Weber et al., 2007) e a secreção de IL-10 (Lalive et al., 2011). Existem estudos que afirmam que a Vitamina D diminui o risco de progresão da EM por induzir apoptose dos linfócitos B ativos, de memória e plasmócitos (Krumbholz et al., 2012). Ainda que diversos medicamentos estejam sendo utilizados e ainda mais estejam sendo desenvolvidos, não é previsto um tratamento que solucione totalmente a EM. Portanto novos estudos estão sendo

desenvolvidos principalmente utilizando anticorpos monoclonais humanizados no intuito de reduzir a progressão da doença.

1.4 Encefalomielite Auto-imune Experimental

A grande maioria dos dados levantados nos estudos de EM foram realizados em modelos experimentais. Utilizando Ags derivados do sistema nervoso central, o modelo de EAE (do inglês *Experimental Autoimmune Encefalomyelitis*) apresenta grandes semelhanças à doença humana. Este é mais comumente induzido em camundongos, mas podendo também ser utilizados ratos, cobaias, coelhos, porcos, macacos entre outros. Linhagens como C57BL/6, SJ/L ou B10.PL são as mais utilizadas, sendo responsivas a ao MOG (do inglês *Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein*), MBP (do inglês, *Myelin Basic Protein*) e PLP (do inglês, *Proteolipoprotein*), respectivamente. Todos apresentam uma doença um tanto similar entre si, apesar de suas diferenças cinéticas (Baxter, 2007).

A indução da EAE se dá através da inoculação de antígenos de mielina emulsificados em CFA (do inglês, *Complete Freund Adjuvant*). Tal procedimento leva a uma intensa ativação do sistema imune, produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, expansão de clones encefalitogênicos e o consequente rompimento da barreira hematoencefálica com inflamação do órgão alvo (Friese et al., 2006). Vários fatores têm tido comprovada importância no fenômeno de iniciação e de transmigração celular durante a EAE. Dentre os mais importantes, talvez as moléculas de adesão como as selectinas (E-, P-, e L-Selectinas) e as interações de integrinas VLA-4 (do inglês *Very Late Antigen*-4) e LFA-1 (do inglês, *Lymphocyte Function-associated Antigen*-1) sejam

as mais importantes, uma vez que medeiam, junto com os receptores de quimiocinas, a migração de células inflamatórias para o parênquima cerebral (Weiner, 2008). Além disso, o uso de toxina de *Bordetella pertussis* durante a imunização possui papel importante na ativação de células endoteliais da barreira hematoencefálica através do TLR-4 (do inglês, *Toll-Like Receptor-4*) (Racke et al., 2005). O engajamento de agonistas de TLRs em astrócitos é também capaz de aumentar a produção de IL-6 e quimiocinas, aumentando o recrutamento de células com potencial inflamatório para o local (Farina et al., 2005).

Após a infiltração do SNC pelas células T ativadas, uma série de fatores próinflamatórios como IL-1, IL-6, IL-12, IL-17. IL-21, IL-23, TNF-α e IFN-γ são
produzidos localmente, ocasionando um aumento da permeabilidade vascular e
consequentemente na infiltração celular. Devido ao fato de que as células T necessitam
ser re-estimuladas *in situ*, o papel de células do parênquima cerebral, como astrócitos,
microglia ou células dendríticas (Bailey et al., 2007) apresentando auto-antígenos é de
grande relevância na ativação local dos clones auto-reativos (Macmahon et al., 2007) .

A produção de quimiocinas como CXCL12 ou CCL2, por astrócitos ou microglia,
também possui papel importante na atração de células T encefalitogênicas ou de
macrófagos ativados para o SNC (Screibert et al., 2006). O bloqueio de CCL19 e
CCL21 ou de seu receptor CCR7 é capaz de diminuir o número de células T migrantes
associadas às células endoteliais da barreira hemato-encefálica e conseqüentemente a
inflamação no SNC (Alt; Engelhardt, 2002). Vale ressaltar também que o CCR6 é de
suma importância para a infiltração no SNC; isso devido ao fato de que células do plexo
coroide expressam CCL20 constitutivamente (Rukiye-Nazan et al., 2008).

1.4.1 As Sub-populações de Células Th1 e Th17 na EAE

Dentre as subpopulações de linfócitos T, a que mais recebeu reconhecimento por seu papel na auto-imunidade foi a resposta Th1. Isso devido a algumas observações, entre elas a de que transferência adotiva de linfócitos Th1 possui a capacidade de induzir EAE passiva e que a sua produção de citocinas esta altamente relacionada com as lesões do SNC estando diminuídas durante o processo de remissão da doença. Outro ponto é que animais deficientes de STAT-4 e T-bet (fatores de transcrição importantes para a diferenciação para Th1) são resistentes ao desenvolvimento da EAE e também de outras doenças auto-imunes como colite (Neurath et al., 2002), uveíte (Jones et al., 1997), artrite (Mins et al., 2004), entre outras. Ainda que tais resultados demonstrem um papel ativo dessa população, outros sinais indicam que tal resposta não é exclusiva desta população celular. Por exemplo, animais deficientes para IFN-γ apresentam níveis de doença tão graves quanto animais selvagens, demonstrado tanto no modelo de EAE (Chu et al., 2000) como de EAU (Jones et al., 1997). Mais interessante é ressaltar que, já em 2003 se demonstrava o papel da IL-23 na EAE, uma citocina pertencente à família da IL-12 que compartilha a cadeia peptídica p40 da mesma, mas que não pertence à resposta Th1. Testes com animais deficientes para a cadeia p19 (fração exclusiva da IL-23) demonstraram uma maior resistência ao desenvolvimento da EAE. Além disso, animais deficientes para a cadeia p35, que pertence somente a IL-12 apresentaram uma EAE similar aos grupos controle (Cua et al., 2003). Tais dados levaram a hipótese de que a IL-23 estivesse envolvida com um novo subtipo de linfócito T patogênico e que este fosse o principal responsável pelo desenvolvimento da EAE. Por volta de 2006 tal hipótese foi comprovada através da descoberta de uma população de células T capazes de secretar grandes quantidades de IL-17 dependente de TGF-β mais IL-6, e mantidas pela ação da IL-23. Tal população ficou conhecida por Th17 (Veldhoen et al., 2006; Volpe et al., 2008).

Sendo os fatores de transcrição STAT-1 e T-bet importantes na geração de células Th1, e STAT-6 e GATA-3 na geração das Th2, ficou demonstrado que o comprometimento de células Th0 para Th17 fica à custa do receptor órfão de ácido retinóico RORyt (Ivanov et al., 2006). Vale ressaltar o quão interessante foi este dado, uma vez que tal fator era anteriormente descrito como sendo encontrado somente no timo e nos intestinos, em regiões chamadas LTi (Lymphoyd Tissue-inducer), ou seja, indutoras de tecido linfóide (Ivanov; Littman, 2006). Através de camundongos transgênicos para TGF-β, Bettelli et al. (2006) demonstrou in vitro que células T naive se diferenciam reciprocamente em Tregs ou Th17 dependendo da presença ou não de IL-6. Mais tarde mostrou-se que outros fatores, dentre eles a IL-1 em humanos (Acosta-Rodriguez et al., 2007) e a IL-21 em camundongos (Korn et al., 2007) também podem ser responsáveis para a geração e expansão dessa patogênica. Demonstrou-se por exemplo que a IL-6 in vivo, induz secreção de IL-21 e 23 as quais induzem a síntese de seus receptores o que culmina na expressão de STAT-3 e RORyt e então na secreção de IL-17 (Zhou et al., 2007). Ao serem geradas na periferia na dependência de IL-6 e TGF-β, tais células são facilmente encontradas após a indução não só de EAE, mas também de outros modelos de auto-imunidade como a artrite reumatoide e psoríase (Dardalhon et al., 2008). Sua ação pró-inflamatória consiste principalmente na produção de altas quantidades de IL-17, IL-21 e IL-22, bem como induzir a síntese de uma ampla variedade de moléculas pró-inflamatórias como IL-6, IL-8, GM-CSF, G-CSF, CXCL, CXCL10 e metaloproteinases por células residentes do SNC, como revisto (Dardalhon et al., 2008).

Porém, durante a EAE são encontradas ambas as populações de linfócitos T encefalitogênicos, (Th1/Th17) os quais podem atuar de maneiras distintas no desenvolver da patologia. Domingues et al. (2010) através da indução de EAE passiva demonstrou certas diferenças dependendo do subtipo de linfócito T transferido. Dentre essas diferenças, animais que receberam apenas células Th17 apresentaram ataxia com andar desequilibrado e alguns camundongos apresentaram uma defeitos axiais graves, enquanto que os animais imunizados com células Th1 desenvolveram uma EAE convencional. Mais recentemente foi demonstrado porém há uma certa plasticidade nessas populações, ou seja, animais recipientes de células Th17 apresentaram células Th1, sendo a distinção da população celular transferida feita através do marcado Thy1.1. De fato, hoje se acredita que tais populações transitam entre um fenótipo Th1 e Th17, dependendo do microambiente no qual as células se encontram, como revisto (Stockinger; Veldhoen, 2007). Por fim, compreendemos que ambas as populações tem papel ativo na patologia de doenças auto-imunes, e principalmente na EM, no entanto vale ressaltar que sua ação se baseará não apenas da interação destas com as células imunes infiltrantes do SNC como também do seu relacionamento com as células residentes do SNC.

Como mencionado anteriormente, as células da microglia participam ativamente na EAE, principalmente na apresentação de antígenos para linfócitos T CD4 e CD8. De fato foi demonstrado que sua ativação e proliferação se inicia no período pré-clínico com mudanças nas suas moléculas ativadoras (CD80, CD86, MHC-II e CD45). Com o desenvolvimento da EAE estas células migram para os locais de lesão atuando em conjunto com as células mononucleares infiltrantes (Ponomarev et al., 2005).

Ao entrar em contato com as células infiltrantes, as células da microglia passam a sofrer o efeito de citocinas pró-inflamatórias como a IL-17, o TNF-α e o IFN-γ, os quais promovem a ativação de uma série de fatores de transcrição, aumentando a expressão de moléculas do MHC, moléculas co-estimuladoras, citocinas como IL-1, IL-6, IL-12, IL-23, óxido nítrico, e neurotransmissores como o glutamato. Demais estímulos podem promover ações diversas nas células da microglia; o estímulo por IL-4 e IL-13 diferente dos anteriores não estimula a produção de óxido nítrico, mas sim um aumento das moléculas de MHC de classe II favorecendo o papel de apresentadora de antígeno dessas células (Ponomarev et al., 2005a). Assim como as células endoteliais e fibroblastos, as células da microglia também são capazes de responder ao estímulo da IL-17, como mencionado acima. Dentre as respostas desencadeadas pela IL-17 observamos aumento na transcrição dos genes de IL-6, MIP-2, ICAM-1 e VCAM, além do aumento da produção de fatores neutrofílicos, como NGF, BDNF e GDNF. Todos somados, esses fatores promovem e mantém o processo inflamatório durante a EAE (Kawanokuchi et al., 2008).

Mesmo que o papel pró-inflamatório das células da microglia esteja cada vez mais elucidado, novos estudos têm demonstrado suas funções reguladoras (Kwidzinski et al., 2005). Dentre estas, uma que merece destaque é a capacidade dessas células expressarem a enzima catalítica indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), com capacidade imunoreguladora importante, tanto que é um potente mecanismo de evasão utilizado por células tumorais (Curti et al., 2007).

1.5 Indoleamina-2,3-dioxigenase

A enzima Indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO) é uma heme-proteína monomérica, localizada no braço curto do cromossomo 8 p12-p11. A IDO tem por função catalisar a oxidação do triptofano à N-formil-quinurenina (NFK). Dentre as células que a expressam IDO podemos citar os monócitos, células dendríticas, macrófagos, eosinófilos, células epiteliais, fibroblastos, células da microglia, entre outros (Okada, 2010). A catabolização do triptofano à NFK tem como produto final o NAD⁺ (do inglês Nicotinamide Adenine Dinucleotide), um co-fator essencial em muitas reações celulares, que vão desde reparo do DNA à síntese de ATP. Vale mencionar que a depleção de NAD+ pode ser fatal para as células, particularmente as que estão sob estresse fisiológico (Moffett; Namboodiri, 2003). Além das ações metabólicas, a IDO tem sido descrita como potente agente imunossupressor. Essa concepção provém da necessidade que células com intensa atividade de síntese protéica têm de aminoácidos como substrato. Com isso, a depleção do triptofano pela IDO dificulta a capacidade proliferativa de células T. De fato Fallarino et al. (2006), demonstrou por ensaios tanto in vitro como in vivo este efeito supressor, além de auxiliar na diferenciação de células T naive em linfócitos T reguladores. A despeito de que já tenha sido demonstrado que a ausência de triptofano ativa uma via de sinalização dependente de GCN2K (Munn et al., 2005), não podemos negligenciar a presença das quinureninas, as quais são ligantes de uma série de diferentes receptores, como Ahr (Opitz et al., 2011), receptor α7 nicotínico e o receptor ionotrópico de glutamato NDMAR, como revisto (Stone et al., 2013). Sendo assim, parece razoável inferirmos que a atividade catalítica da IDO repercute em fenômenos que são dependentes tanto da depleção de triptofano como da presença das quinureninas, evidenciado a complexidade deste sistema. A ação supressora da IDO tem sido descrita em diversos processos biológicos, entre eles na relação materno-fetal (Mellor et al., 2001), e também em diversas desordens do SNC, incluindo demência relacionada à AIDS e malária cerebral (Bal et al., 2009). Os demais metabólitos provenientes da via das quinureninas, como o ácido antranílico, pode inibir a proliferação de células T *in vitro* e, quando administrado sistemicamente prolongam significativamente a sobrevida de enxerto alogênico de pele *in vivo* (Brandacher et al., 2008). Corroborando tal estudo, Platten et al. (2005) demonstraram que camundongos com EAE tratados com ácido antranílico, tem pontuações mais brandas da doença quando comparados aos controles. Os mecanismos envolvidos são *downregulation* de moléculas co-estimulatórias com redução da proliferação das células T. Além deste, Baban et al. (2009) mostraram que células dendríticas plasmocitóides ativadas por ligantes de TLR-9 passam a expressar a IDO e esta é fundamental no controle da diferenciação de células T em células T reg ou Th17.

Ainda que sua ação supressora se mostre efetiva na modulação dos linfócitos T, os efeitos de seus subprodutos no SNC podem acarretar em excitoxicidade, promovendo o desenvolvimento de doenças neurais como Alzheimer, convulsões e demência (Anderson; Rodriguez, 2011). Tais ações citotóxicas são provenientes principalmente de dois metabólitos da via da quinureninas: O ácido quinolínico (QUIN) que atua como um agonista dos receptores NMDA de glutamato e o ácido 3-hidroxianthranílico (3-HAA), o qual em situações não fisiológicas pode sofrer auto-oxidação e gerar espécies reativas de oxigênio e induzir morte neuronal. Outro ponto a salientar é a necessidade do triptofano para o desenvolvimento da serotonina, e que a falta deste aminoácido essencial pode gerar falhas na sinalização desse neurotransmissor facilitando o

desenvolvimento de casos de depressão (Kwidzinski; Bechmann 2007; Dantzer et al., 2008).

Levando-se em consideração esses dados, fica clara a necessidade de uma melhor compreensão dos fenômenos que envolvem a atividade da IDO, principalmente sua repercussão dentro do sistema nervoso central. Neste contexto, tivemos como objetivo avaliar o papel imunomodulador da IDO expressa por células da microglia durante a neuroinflamação do SNC.

2 OBJETIVOS:

2.1 Objetivo Geral

No presente projeto visamos estudar a capacidade moduladora das células da microglia sobre a resposta dos linfócitos T através da expressão de indoleamina-2,3-dioxigenase.

2.2 Objetivos Específicos

- 1. Avaliar a expressão das citocinas IL-6, IL-10, IL-23, IL-27, TGF-β por células de microglia ativadas *in vitro* com LPS ou IFN-γ.
- Avaliar a expressão de IDO em células de microglia ativadas *in vitro* com LPS ou IFN-γ.
- Avaliar a capacidade funcional da IDO através da supressão da proliferação de células T CD4⁺ específicas para MOG₃₅₋₅₅
- 4. Avaliar *in vivo* a expressão e capacidade funcional da IDO através da supressão de proliferação de células T CD4⁺ específicas para MOG₃₅₋₅₅ em animais com EAE.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos e fêmeas C57BL/6 de 6-8 semanas provenientes do biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB – USP), mantidos em microisoladores contendo 5 animais em cada. Os animais receberam água e ração *ad libitum*. Todos os experimentos foram realizados sob as diretrizes da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Os camundongos transgênicos 2D2 possuem TCR específico para MOG₃₅₋₅₅ e foram doados pelo Professor Doutor Alexandre Salgado Basso do Departamento de Microbiologia, Parasitologia e Imunologia da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp).

3.2 Indução de EAE ativa e Tratamento com Pellet de 1-MT

✓ Indução da EAE ativa

Camundongos fêmeas C57BL/6 receberam injeção subcutânea de 150 μg de MOG₃₅₋₅₅ (mielina de oligodendrócito de seqüência *MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK*, sintetizado pelo Dr. Teplow da Facility Biopolymer do Centro de Doenças Neurológicas, Boston, MA ou por Proteimax Biotecnologia - São Paulo - SP - Brasil.) e emulsificado em CFA (do inglês *Complete Freund Adjuvant*) (v/v), contendo 500 μg de BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*). Após a injeção com MOG₃₅₋₅₅, os camundongos receberam duas doses de 200 ng da toxina *Bordetella pertussis* por via intraperitoneal, nos períodos de 0 e 48 h após a imunização. Todos os animais foram acompanhados

diariamente por 20 dias e o grau de doença dado como a seguir: 0 - Nenhuma doença, 1 - Cauda flácida, 2 -Dificuldade de locomoção, - 2,5 - Patas traseiras parcialmente paralisadas, 3 - Patas traseiras completamente paralisadas, 4 - Paralisia completa das patas traseiras junto a paralisia parcial das patas dianteiras, 5 - Paralisia completa ou morte.

✓ Tratamento com Pellet de 1-MT

Foi realizada a inserção dos pellets contendo 1-metil triptofano (1-MT) com liberação de 10 mg/dia nos camundongos 24 horas antes do protocolo de imunização acima referido. Para a realização da inserção os camundongos foram devidamente anestesiados e através de uma pequena secção realizada ao lado do pescoço do animal, conforme especificado pelo fabricante, o pellet foi gentilmente implantado e o corte suturado. Os animais foram observados diariamente por 21 dias no experimento de imunização ativa e sete dias após transferência passiva.

3.3 Culturas celular da linhagem de microglia C8-B4

Células da microglia da linhagem C8-B4 foram obtidas da ATCC[®] (http://www.atcc.org/Products/All/CRL-2540.aspx) e mantidas em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino (SFB) e gentamicina a 50 μg/ml. Para a realização dos experimentos as células foram plaqueadas em placa de 6 poços com fundo chato, tendo a concentração de 250.000 células por poço. Após 3 dias de cultivo, as células foram lavadas com meio DMEM sem SFB e estimuladas com 1 μg/ml de LPS ou 100 UI/ml ou 100 ng/ml de rmIFN-γ diluídos em meio completo (DMEM com 10% SFB, gentamicina 50 μg/ml). Após 12 horas de incubação as células foram novamente lavadas com meio DMEM sem SFB e usadas como desejado.

3.4 Cultura primária de microglia

As culturas primárias de microglia foram obtidas como descrito por Ponomarev et al. (2005a). Após sacrifício de camundongos machos C57BL/6 de 6-8 semanas em câmara de CO2, o Sistema Nervoso Central e a medula espinhal foram dissecados, dissociados, colocados em placas de Petry contendo uma solução de 2,5 mg/ml de colagenase D (Roche®) (10 mg de colagenase D em 4 ml de DMEM) e mantidos por 45 minutos em estufa de CO₂ a 37°C. Após a incubação, as amostras foram processadas em cell strainers e transferidas para tubos falcon de 15 ml. Os tubos foram então centrifugados a 450 g por 5 minutos a 4°C, e o pellet formado foi ressuspendido em 6 ml de Percoll (Sigma[®]) a 37%, esta suspensão foi lentamente vertida em novos falcons de 15 ml contendo Percol 70% seguindo-se de centrifugação a 950 g por 20 minutos a 4°C com o freio desativado. Ao fim da centrifugação a fase superior composta por uma grande concentração de mielina foi coletada por sucção e desprezada e o anel, formado por células mononucleares na intersecção das soluções de Percol 37% e Percol 70%, foi coletado e transferido a falcons de 15 ml contendo DMEM gelado. As células foram centrifugadas a 450 g por 5 minutos a 4°C e o pellet foi ressuspendido em 5 ml de meio DMEM. Em seguida as células foram contadas e adicionadas em placas de 96 wells fundo plano (20.000 células por well) ou de 24 wells fundo plano (100.000 células por well) sendo mantidas em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino (SFB), gentamicina 50 µg/ml e M-CSF (Biolegend) 10 ng/ml. Para uma melhor visualização, vide Figura 1. As células foram cultivadas por 15 a 20 dias, e o meio foi trocado a cada 4 ou 5 dias. Ao final do cultivo as células foram lavadas com meio DMEM sem SFB e estimuladas com 1 μg/ml de LPS ou 100 UI/ml ou 100 ng de rmIFN-γ diluídos em meio completo (DMEM com 10% SFB, gentamicina 50 µg/ml e M-CSF (Biolegend) a 10 ng/ml). Após 12 horas de incubação as células foram novamente lavadas com meio DMEM sem SFB e usadas como desejado.

Figura 1:

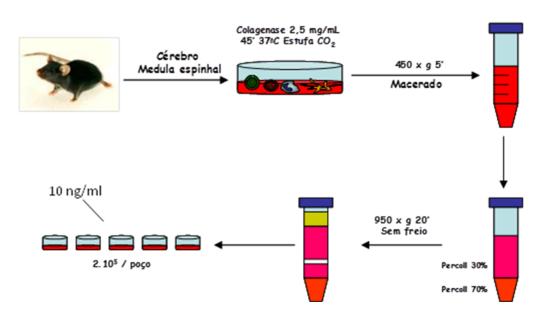


Figura 1. Procedimento para obtenção de células mononucleares do SNC. SNC de Camundongos C57BL/6 foram extraídos e masserados em colagenase D 2,5 mg/ml e mantidos por 45 minutos em estufa de CO₂ a 37°C. Após a incubação as amostras foram processadas e centrifugados a 450 g por 5 minutos a 4°C, e o pellet formado foi ressuspendido em 6 ml de Percoll (Sigma®) a 37%, esta suspensão foi lentamente vertida em Percol 70% seguindo-se de centrifugação a 950 g por 20 minutos a 4°C com o freio desativado. O anel de células mononucleares adicionadas em placas de 96 wells fundo plano (20.000 células por well) ou de 24 wells fundo plano (100.000 células por well) sendo mantidas em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino (SFB), gentamicina 50 μg/ml e M-CSF (Biolegend) 10 ng/ml.

3.5 Ensaio de proliferação *in vitro* e *in vivo* de linfócitos CD4⁺ específicos para MOG₃₅₋₅₅.

Os camundongos 2D2 foram anestesiados, sacrificados e seus linfonodos (inguinal superficial, sub-axilar, peri-aórtico e sub-mandibular) foram dissecados, e o total de células CD4⁺ foi isolada por método de beads magnéticos L3T4 (Miltenyi Biotech).

✓ Resposta proliferativa *in vitro*

➤ Co-cultivo com células de linhagem C8-B4

Após o isolamento, as células CD4⁺ foram co-cultivados com células da microglia de linhagem C8-B4 estimuladas com 100 μg/ml de MOG₃₅₋₅₅ e 100 mM de 1-MT por 4 dias. Nas últimas 12 horas, foram adicionados às culturas 1μCi por well de timidina-H³. A proliferação celular foi avaliada através da emissão de radiação β no aparelho Beckman LS 100C.

Co-cultivo com cultura primária de microglia.

As células CD4⁺ dos animais 2D2 foram isoladas e marcadas com CFSE. Estas foram co-cultivados com células da microglia pulsadas com100 μg/ml de MOG₃₅₋₅₅ na presença de 100 mM de 1-MT por 4 dias. Estas células foram coletadas e submetidas à análise por citometria de fluxo de CD4 e CFSE.

✓ Resposta proliferativa *in vivo* – Modelo de EAE Passiva

Esplenócitos totais de camundongos 2D2 foram isolados, plaqueados e estimulados com 100 μg/ml de MOG₃₅₋₅₅, na presença de 1 μg/ml de LPS, acrescido de 20 ng/ml de rmIL-6. Após sete dias, as células T CD4⁺ foram isoladas por *beads magnéticos* conforme protocolo do fabricante e marcadas com CFSE. Um milhão destas células foram então injetadas por via intravenosa em camundongos fêmeas C57BL/6, previamente tratadas com 1-MT conforme protocolo descrito, a qual desenvolvem EAE passiva. No 7° dia pós-transferência, as células mononucleares infiltrantes no Sistema Nervoso Central foram extraídas e submetidas à análise por citometria de fluxo.

3.6 Imunofluorescência

✓ Sistema Nervoso Central

Para esta técnica foram utilizados os animais imunizados para MOG₃₅₋₅₅. No 10° dias pós-imunização, início da doença, os camundongos foram anestesiados e perfundidos com PBS, tendo o Sistema Nervos Central dissecado. O tecido coletado foi colocado em solução de 4% de sacarose por 24 horas e posteriormente em solução de sacarose 20%. As amostras foram então submetidas ao protocolo de congelamento e levadas ao criostato. Os cortes foram fixados em lâmina com metanol por 5 minutos e posteriormente foi realizada a permeabilização com Triton X 100 a 0,5% por 10 minutos. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com soro de coelho durante 1 hora a temperatura ambiente. Foram realizadas duas lavagens e as lâminas foram então incubadas com anticorpo policlonal de cabra anti-camundongo anti-IDO (Santa Cruz[®]) por uma hora a temperatura ambiente em câmara úmida. Os anticorpos anti-IDO específicos foram marcados com FITC através do kit de marcação de proteína da Pierce[®]. As lâminas foram lavadas e incubadas com DAPI para a visualização nuclear. As análises e aquisições de imagem foram realizadas em microscópio de fluorescência (Nikon[®]).

✓ Imunofluorescência de culturas

Para esta técnica foram realizadas cultura de células de linhagem (C8-B4) e cultura primária em lâminas especialmente desenhadas para este propósito. Após o cultivo (4 dias para cultura de C8-B4 e 14 dias para cultura primária) as células foram incubadas *overnight* com 1 μg/ml de LPS ou 100 ng/ml de rmIFN-γ, sendo a cultura primária incubada apenas com o LPS. Após o período de incubação as lâminas foram lavadas 3

vezes com PBS e posteriormente fixadas com metanol 100% por 20 minutos a temperatura ambiente, seguida de nova lavagem com PBS. A seguir as lminas foram incubadas com uma solução de glicina 40 mM em PBS por 5 minutos, a qual se seguiu nova lavagem. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com solução de bloqueio (Triton 0,05%, BAS 1% em PBS) durante 2 horas a temperatura ambiente. Após lavagens, as lâminas foram então incubadas com anticorpo primário em diluição específica (70 µl por poço em chamberslide de 8 poços; marcação para microglia – lectina de tomate marcada com FITC (1:1.000); marcação para IDO - anticorpo anti-IDO (1:50) overnight à 4°C em câmera escura. As lâminas foram lavadas por 5 vezes e incubadas por duas horas em temperatura ambiente em câmera escura com anticorpo secundário específico (70µl por poço; IDO – alexa flúor 594) diluídos em solução de PBS e Triton 0,05%. Posteriormente as laminas foram novamente lavadas por 5 vezes e as divisórias foram retiradas, tomando cuidado para que não sobre silicone, evitando assim a formação de bolhas. Foram acrescentado 4 gotas de 8 µl entre os poços de Vectashield acrescido de DAPI para a visualização nuclear. As lâminas foram então seladas com lamínula evitando a formação de bolhas e guardadas à 4°C em câmara escura por 24 horas antes da obtenção das imagens. As análises e aquisições de imagem foram em microscópio de fluorescência (Nikon®).

3.7 Real Time PCR

✓ Extração do RNA

Todo o material utilizado deverá estar RNAse free. A homogeneização das células foi feita em TRIzol® (Invitrogen). Adicionou-se 1 mL do reagente para a homogeinização e aguardou-se 5 minutos em temperatura ambiente. A seguir 200 μL,

de clorofórmio foram adicionados para separação das fases, agitou-se manualmente e aguardou-se de 2 a 3 minutos. Os eppendorffes foram centrifugados a 12.000 rcf por 15 minutos à temperatura de 4°C, após este procedimento obteve-se a separação do RNA, DNA e das proteínas. O RNA foi então separado em novo eppendorf a qual foi adicionado 500 μL de isopropanol, o conteúdo foi vortexado e deixado em repouso a temperatura ambiente de 45 minutos a 1 hora. Procedeu-se nova centrifugação por 15 min em 12.000 rcf à 4°C e o sobrenadante foi descartado evitando contato com o precipitado de RNA. Adicionou-se 1ml de etanol 75% e centrifugou-se a 7.500 rcf por 5 min à 4°C, removeu-se o sobrenadante e o precipitando foi seco em bancada, por aproximadamente 5 minutos. Após a secagem o RNA foi ressuspendido em 25 μL de água ultra pura (RNAse/DNAse free). A quantificação do RNA foi feita em NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

✓ Preparação do cDNA

Utilizou-se uma concentração de 1μg/μL de RNA, diluído em 13 μL de solução aquosa RNAse/DNAse free, adicionou-se 1 μL de Oligo dT e 1 μL de dNTPmix (10mM de dATP, dTTP, dCTP, dGTP), misturou-se utilizando a pipeta. Esta mistura foi levada ao termociclador por 5 minutos à 65°C, sendo a reação seguida por incubação em gelo por 1 minuto. O próximo passo consistiu na adição de 4 μL de 5x first-strand Buffer, 1 μL de DTT 0,1 M e 1 μL de Super Script III RT 200 U/μL. A solução foi novamente homogeneizada com a pipeta, e levada ao termociclador por 60 min à 50°C no primeiro ciclo, 15 minutos à 70°C no segundo ciclo e posteriormente 5 minutos à 4°C. O cDNA foi armazenado à -20°C até realização das análises.

✓ PCR em tempo Real

O cDNA preparado foi diluído em uma proporção de 1:5, sendo então utilizados 5 μL da solução para cada análise. Foi preparado um meio reacional contendo 1 μL de 20x Taqman Gene Expression Assay, 10 μL de 2x Taqman Gene Expression Assay Master Mix e 4 μL de água ultra pura (RNAse/DNAse free), este meio foi pipetado nos tubos Strip®, e em seguida foi adicionado a solução de cDNA. A partir deste momento a reação foi levada ao termociclador Applied Biosystems 7900HT Real-Time PCR System®.

Os primers analisados são:

Primer	Locus
IL-1β	NM_008361
TNF-α	NM_013693. 2
IL-6	NM_031168. 1
TLR2	NM_011905. 3
TLR4	NM_021297. 2
IL-18	NM_008360. 1
II-23	NM_031252. 2
IL-10	NM_010548. 2
TGF-β	NM_011577. 1

IL-27	NM_145636. 1
SOCS3	NM_007707. 3
β-actina	NM_007393. 3

3.8 Citometria de fluxo

✓ Avaliação da expressão de moléculas de superfície

Foram plaqueadas 1.10⁶ células e posteriormente ressuspendidas em 80ul de Fc block para impedir a ligação inespecífica dos anticorpos, sendo a incubação realizada por 20 minutos a 4°C. Logo após este processo as células foram centrifugadas a 450g 4°C por 5 minutos e ressuspendidas com os anticorpos específicos anti-CD4, anti-CD11b, anti-CD40, anti-CD45, anti-CD80 e anti-CD86 (todos da marca Ebioscience[®]) conjugados com os fluorocromos (Alexa Fluor 488, FITC, PE, Pacifc Blue, PERCP ou APC). As células foram então incubadas pelo período de 20 minutos a 4°C, posteriormente foram lavadas duas vezes com 200 µl de PBS e centrifugadas a 450g 4°C por 5 minutos.

✓ Avaliação da expressão de marcadores intracelular

As amostras foram ressuspendidas em 100ul de Fixperm[®] e incubadas por 20 minutos a 4°C sendo em seguida lavadas com 100ul de Permwash[®] e centrifugadas a 450g a 4°C por 5 minutos. Após este processo as células foram então incubadas com o coquetel de anticorpos desejados. As células foram posteriormente lavadas,

centrifugadas a 450g 4°C por 5 minutos e ressuspendidas em 200ul de paraformoldeído 1%.

Além destas análises houve a marcação das células CD4⁺ por CFSE. A aquisição e análise das amostras foram realizadas em citômetro de fluxo FACScalibur ou FacsCanto (Becton & Dickinson, Mountain View, CA).

3.9 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada em 3 partes:

- ✓ Curva de doença para EAE ANOVA de duas vias seguido do pós teste de Bonferroni.
- ✓ *Real-time* PCR Teste *t Studant* paramétrico.
- ✓ Outros ensáios ANOVA de uma via.

Todas as análises foram feitas utilizando-se o software Graphpad Prism 5, e foram considerados estatisticamente significativos quando p<0,05.

3.10 Comitê de Ética

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética da Faculdade de Medicina CEUA de número 164/11. O mesmo encontra-se aprovado no comitê de ética do Instituto de ciências Biomédicas ICB-USP/CEUA sob o protocólo registrado pelo número 026 nas fls 100 do livro 2...

4.0 RESULTADOS

4.1 Linhagem de Células da Microglia C8-B4

Um dos objetivos principais de nosso trabalho é avaliar se as células da microglia possuem mecanismos para suprimir a resposta imune *in vivo*. Para tanto, iniciamos nosso trabalho com a caracterização de uma linhagem de microglia provenientes da ATCC e extraídas do cerebelo de camundongos neonatos C57Bl/6 conhecida por C8-B4. As células eram mantidas em meio DMEM 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos. O meio era trocado a cada 3-4 dias devido à grande capacidade proliferativa desse clone. Fico definido o período de 3 dias de cultivo antes da realização dos experimentos (Figura 2).

Figura 2:

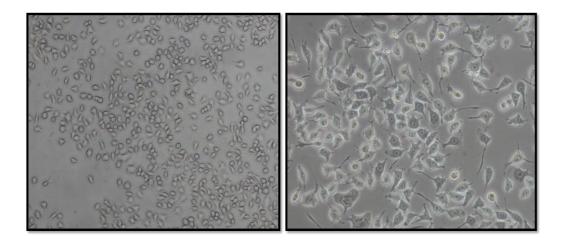
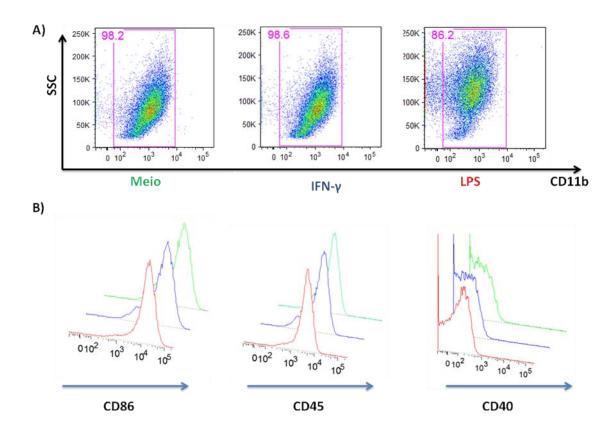


Figura 2. Fotos das culturas da linhagem de microglia C8-B4 ao 3° dia de cultura. As células foram mantidas em meio DMEM com gentamicina a 50 μ g/ml, 10% soro fetal bovino e repicadas a cada três dias em garrafas de 75 cm².

Para avaliarmos o papel funcional da enzima indoleamina-2,3-dioxigenase nas células da microglia, estimulamos as mesmas com LPS ou rmIFN-γ, como descrito nos

materiais e métodos e posteriormente avaliamos a expressão de moléculas coestimuladoras através de citometria de fluxo (Figura 3). Nossos resultados demonstram que mesmo após ativação não há diferença na porcentagem de células positivas para os marcadores avaliados. Todavia observamos um aumento expressivo na média da intensidade de fluorescência (MFI) das moléculas CD86, CD45 e CD40 após o estímulo por LPS. Já o estímulo com rmIFN-γ promoveu o aumento apenas da expressão de CD86 e CD45 (Figura 3C).

Figura 3:



c)

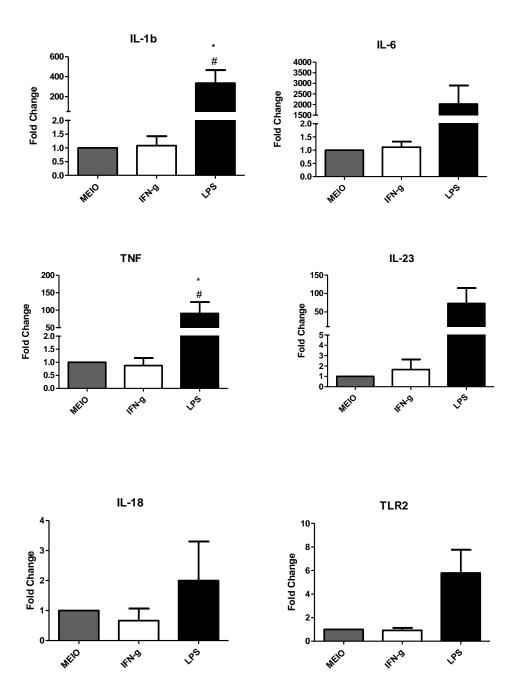
	MFI de CD86	
	LPS = 19612	INF- $\gamma = 18186$
Meio = 16281		
	MFI de CD45	
Meio = 1889	LPS = 4572	$INF-\gamma = 3552$
	MFI de CD86	
Meio = -111	LPS = 73.4	INF- $\gamma = -111$

Figura 3. Viabilidade das culturas de células da microglia C8-B4. A) Avaliação da viabilidade celular das C8-B4 estimuladas ou não com 1 μg/mL de LPS ou 100ng/mL de rmIFN-γ por 24 horas. B) Estado de ativação das células da microglia avaliado através da expressão das moléculas coestimuladoras CD80, CD86 e CD45. C) Tabela com os valores da média de intensidade de fluorescência (MFI) das moléculas co-estimuladoras avaliadas

4.1.1 Expressão de Citocinas e TLRs

Continuando com nossas análises, para uma melhor caracterização do perfil próinflamatório das células da microglia, utilizamos *primers* para TLR-4, TLR-2, IL-1β, IL-6, IL-18, IL-23 e TNF-α, fatores importantes na resposta imune no SNC. Como pode ser observado na figura 4, o estímulo com LPS aumentou significativamente a transcrição de IL-1 β e TNF-α junto a tendência de aumento para IL-6, IL-23 e TLR-2. Por outro lado a ativação com rmIFN-γ não alterou a expressão dos fatores avaliados.

Figura 4:



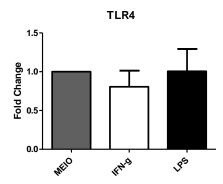
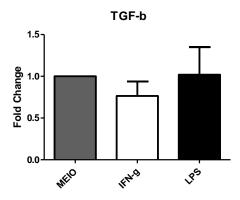
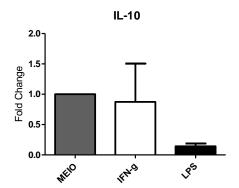


Figura 4. Avaliação da expressão de moléculas pró-inflamatórias após estimulação com LPS e rmIFN-γ. Após 3 dias de cultura as células foram incubadas por 24 horas com 1 μg/mL de LPS ou 100 ng/mL de rmIFN-γ. Após a incubação as células foram coletadas e mRNA extraído para análise.

Para caracterizarmos o perfil anti-inflamatório, avaliamos a expressão de TGF-β, IL-10, IL-27 e SOCS-3 (do inglês, *Suppressor of Cytokine Signalling*). Nossos resultados demonstraram que a ativação por LPS leva a um aumento exclusivo de IL-27 e uma redução de SOCS-3 e IL-10. Em contrapartida, a estimulação por IFN-γ induziu unicamente a diminuição da expressão de SOCS-3 (Figura 5).

Figura 5:





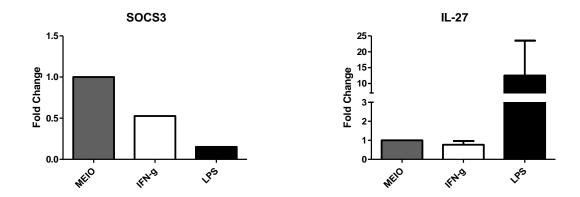


Figura 5. Expressão de fatores anti-inflamatórias após estimulação com LPS e rmIFN-γ. Após 3 dias da cultura as células foram incubadas por 24 horas com 1 μg/mL de LPS ou 100 ng/mL de rmIFN-γ. Após a incubação as células foram coletadas e mRNA extraído para análise.

4.1.2 Avaliação da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase - IDO

Há alguns anos foi demonstrado que a ativação da enzima IDO em células dendríticas era capaz de exercer capacidade supressora sobre os linfócitos T (Andrew L. Mellor AN et al., 2003). Sendo assim, resolvemos avaliar se tal fenômeno se repete para células da microglia dentro do sistema nervoso central. Para tanto avaliamos a expressão de IDO por imunofluorescência em culturas de células C8-B4 estimuladas ou não por LPS (6B) ou rmIFN-γ (6C). Como pode ser observada na figura 6, a expressão de IDO não se altera na presença dos estímulos utilizados. A partir de então resolvemos avaliar se a expressão de IDO é funcional e assim suprimir a proliferação de linfócitos T. Para tanto realizamos uma co-cultura de células T CD4 de camundongos 2D2 (TCR específico para MOG₃₅₋₅₅) com células da microglia pré-estimuladas com rmIFN-γ e pulsadas com o antígeno MOG₃₅₋₅₅ na presença ou não de 1- metil triptofano (1-MT), o inibidor da IDO (Figura 6). Nossos resultados demonstram uma maior resposta proliferativa das células T na presença do inibidor quando comparado às culturas controle.

Figura 6:

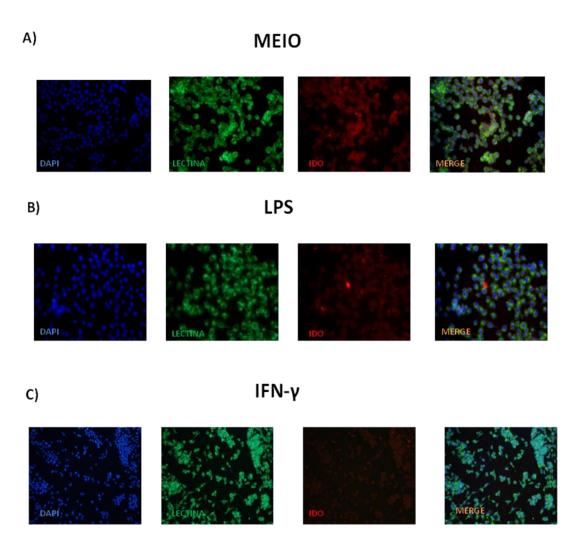


Figura 6: IDO é expressa pela linhagem C8-B4 *in vitro*. As células da microglia C8-B4 foram estimuladas (B) ou não (A) com $1\mu g/ml$ de LPS ou 100 ng/ml de rmIFN- γ (C) durante 12 horas. Posteriormente as células foram lavadas e submetidas ao protocolo de marcação por imunofluorescência para: Lectina de tomate – FITC, anti-IDO Alexa Fluor 594 e DAPI (Azul).

Figura 7:

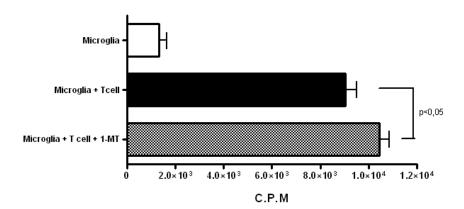


Figura 7: Ensaio de linfoproliferação. As células da microglia foram previamente estimuladas com 100 UI/mL de rmIFN- γ e pulsadas com MOG 35-55. As células foram então e co-cultivadas com células T CD4⁺ 2D2 específicas para MOG₃₅₋₅₅, durante 4 dias na presença ou ausência de 1-MT . A resposta proliferativa foi avaliada pela incorporação de timidina –H³. One-way ANOVA. p<0.05.

4.2 Cultura Primária das Células da Microglia

Até então realizamos nossos experimentos avaliando o perfil de ativação e também a expressão e funcionalidade da IDO em células de uma linhagem de microglia, C8-B4. A partir de então resolvemos avaliar a expressão de IDO em células da microglia obtidas a fresco. Para tanto, células da microglia de animais adultos foram obtidas e mantidas como descrito nos materiais e métodos de acordo com Ponomarev E at al. (2005a). A figura 8 mostra a morfologia característica deste tipo celular, com corpo celular pequeno, globular e ramificado apresentando dois processos ou mais.

Figura 8:

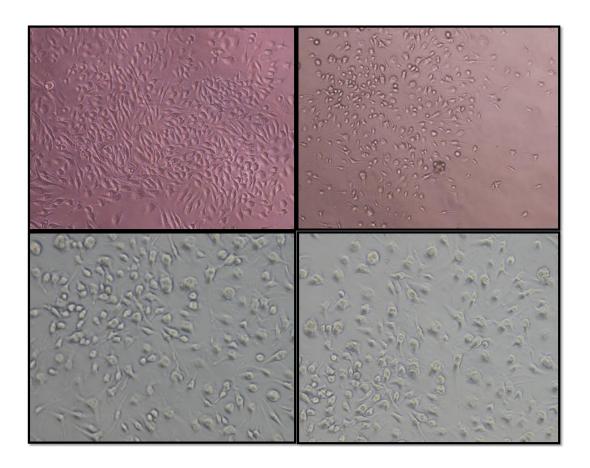


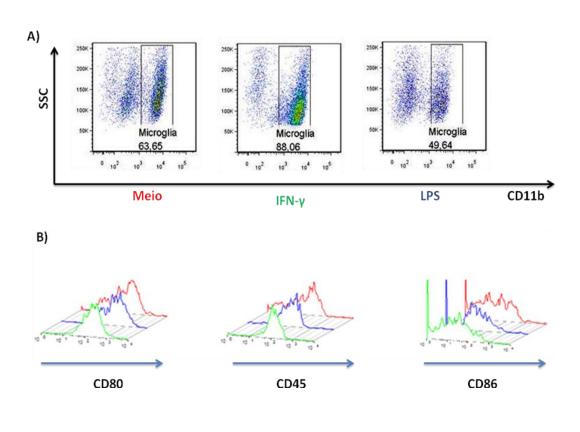
Figura 8. Fotos de culturas de microglia de animais adultos ao 14° dia de cultura. As células foram mantidas em meio DMEM com glutamina, gentamicina a $50~\mu g/ml$, 10% soro fetal bovino e 10~ng/mL de M-CSF.

A pureza e viabilidade celular foi analisada por citometria de fluxo utilizando o CD11b como marcador desta população celular . Como demonstrado na figura 9, podemos observar que nossas culturas possuem níveis variáveis de pureza, dependendo do estímulo aplicado, rmIFN-γ ou LPS (Figura 9A). Nossos resultados demonstram que ocorre uma ligeira diminuição da viabilidade celular após estímulo por LPS, quando comparadas aos grupos controles ou IFN-γ. Este último por sua vez demonstrou melhora na viabilidade, atingindo um aumento de 25% em relação ao grupo controle. Além disso, analisamos a expressão de moléculas co-estimuladoras, determinando

assim o nível de ativação celular (Figura 9B). Nossos resultados demonstram que mesmo após estímulos não há diferenças na porcentagem células que expressam CD80 CD86 e CD45. Por outro lado, observamos um aumento na MFI, após estímulo tanto com LPS quanto com rmIFN-γ.

Figura 9:

C)



	MFI de CD45	
Meio = 54	LPS = 98.8	$INF-\gamma = 129$
	MFI de CD80	
Meio = 116	LPS = 317	INF- $\gamma = 232$
	MFI de CD86	
Meio = 1.01	LPS = 20.2	$INF-\gamma = 1.01$

Figura 9. Caracterização das culturas primárias de microglia. A) Avaliação da viabilidade celular de células da microglia estimuladas ou não com 1 μg/mL de LPS ou 100 UI/mL de rmIFN-γ por 24

horas. B) Estado de ativação das células da microglia através da expressão de moléculas coestimulatórias CD80, CD86 e CD40. C) Tabela com os valores da média de intensidade de fluorescência (MFI).

4.2.1 Expressão de Genes para Citocinas

Para a determinação do perfil pró-inflamatório utilizamos *primers* para TLR-2, TLR-4, IL-6 e IL-23. Após estímulo com LPS, observamos um aumento na transcrição de IL-6 e IL-23. Por sua vez a ativação por rmIFN-γ não promoveu nenhuma alteração (Figura 10).

Figura 10:

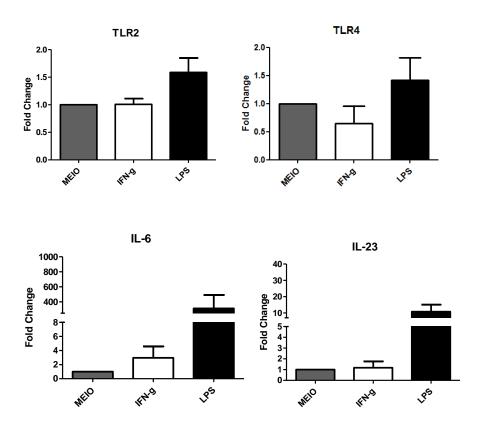


Figura 10. Avaliação da expressão de citocinas pró-inflamatórias após estimulação com LPS e rmIFN-γ. Após 14 dias da cultura com a rmM-CSF, as células foram incubadas por 24 horas com 1 μg/mL de LPS ou 100 U/mL de rmIFN-γ. Após a incubação as células foram coletadas e mRNA extraído para análise.

Já para o perfil anti-inflamatório, tivemos por escolha avaliar a transcrição dos genes para TGF-β, IL-10, IL-27 e SOCS-3. Nossos resultados demonstraram que a ativação por LPS também leva a um aumento na expressão de moléculas imunossupressoras, sendo este aumento evidente nas quatro moléculas citadas a cima (Figura 11)

.

Figura 11:

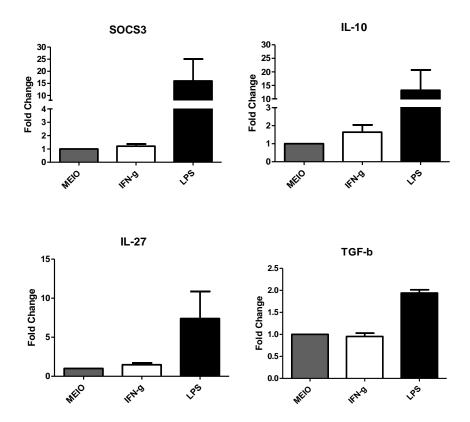


Figura 11. Avaliação da expressão de moléculas anti-inflamatórias após estimulação com LPS e IFN-γ. Após 14 dias da cultura com a M-CSF, as células foram incubadas por 24 horas com 1 μg/mL de LPS ou 100 U/mL de rmIFN-γ. Após a incubação as células foram coletadas e mRNA extraído para análise.

4.3. Avaliação da Expressão de IDO em Culturas Primárias de Células da Microglia

Há alguns anos foi demonstrado que a ativação da enzima IDO em células dendríticas eram capazes de exercer capacidade supressora sobre os linfócitos T (Mellor AL et al., 2003, Fallarino F et al., 2006). Com base nesses dados da literatura, procuramos avaliar a expressão dessa enzima em nossas células, sendo este talvez um dos mecanismos utilizados pela microglia para modulação da resposta imune durante processos neuroinflamatório ou neurodegenerativos. Após os testes em linhagem celular, passamos a avaliar a atuação da IDO em de cultura células primária de microglia. Para tanto utilizamos a técnica de RT-PCR (Figura 12) e imunofluorescência (Figura 13). Utilizamos as células da microglia após 14 dias de cultivo e estimuladas por LPS ou IFN-γ. O resultado que se sucedeu foi o aumento da expressão da IDO por LPS, o qual não ocorreu com a adição de rmIFN-γ (Figura 12).

Figura 12:

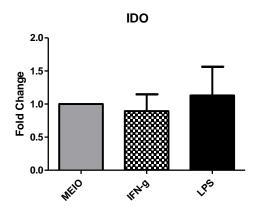


Figura 12. Avaliação da expressão de IDO nas células da microglia. Após 14 dias da cultura com M-CSF as células foram incubadas por 24 horas com 1 μg/mL de LPS ou 100 U/mL de rmIFN-γ. Após a incubação as células foram colhidas e mRNA extraído para análise.

Posteriormente, passamos a avaliar a expressão de IDO atavés de imunofluorescência para averiguar a presença da enzima IDO e não somente de seu mRNA. Para a visualização da mesma optamos por estimular as células também com 1 μg/mL de LPS. Como mostra a figura 13, podemos então confirmar a presença desta enzima em células da microglia após estímulo.

Figura 13:

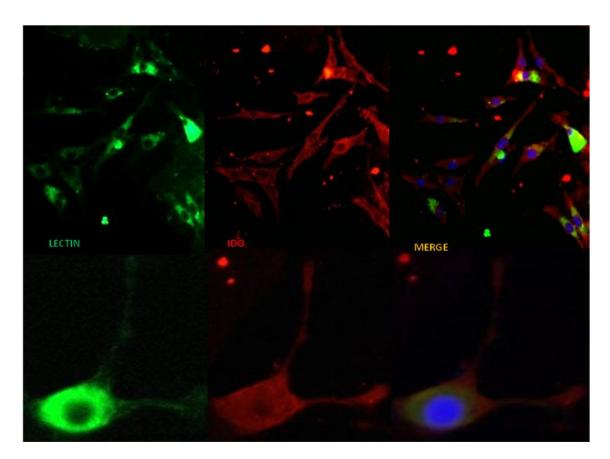


Figura 13. Avaliação da expressão de IDO nas células da microglia por imunofluorescência. Após 14 dias da cultura com rmM-CSF as células foram incubadas por 24 horas com 1 μg/mL de LPS e submetidas ao protocólo de marcação por imunofluorescência para detecção de: Lectina de tomate (FITC), IDO alexa fluor 594 (vermelho) e DAPI (azul).

4.3.1 Avaliação Funcional

Com a intenção de confirmar os efeitos supressores da IDO pertencente a microglia de animais adultos, realizamos o mesmo modelo de experimento utilizado na linhagem C8-B4 para testar a funcionalidade da enzima. Desta vez, utilizamos uma co-cultura de células primárias obtidas de animais adultos e células T de animais 2D2 pulsadas com MOG₃₅₋₅₅ estimuladas com rmIFN-γ ou LPS na presença ou ausência de 1-MT. Na figura 14, demonstramos que ocorre interação direta entre estes dois tipos celulares, sugerindo a capacidade de apresentação de antígenos. Como demonstrado pela figura 15A, há uma maior proliferação linfocitária na presença do inibidor de 1-MT, evidenciado através das células CD4+ CFSE^{low} que passam de 66,1% para 89%. A figura 15B ilustra o número de divisões celulares destas células, os quais são maiores no grupo tratado com o inibidor.

Figura 14:

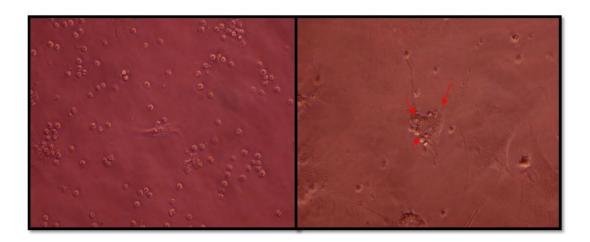
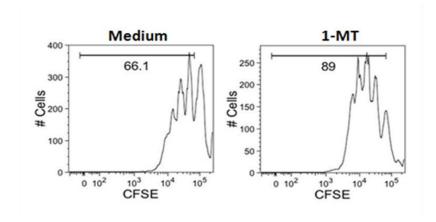


Figura 14. Co-cultura de microglia com células T CD4+ MOG₃₅₋₅₅ específicas. Fotos tiradas do contanto das células da microglia com linfócitos T CD4+ no período de 72 horas. Setas demonstram linfócitos T CD4.

Figura 15:

A)



B)

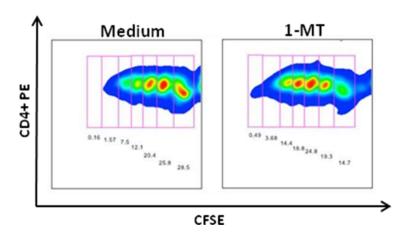


Figure 15. Expressão de IDO por células da microglia suprime a proliferação das células T específicas para MOG₃₅₋₅₅. As culturas primárias de células da microglia foram preparadas como descritas nos materiais e métodos. As células foram previamente estimuladas com 1μg/mL de LPS *overnight* e em seguida as células T CD4 de 2D2 específicas para MOG₃₅₋₅₅ marcadas com CFSE foram adicionadas à cultura na presença ou ausência de 1-MT. Após 4 dias as células foram coletadas e submetidas ao protocolo de marcação para citometria de fluxo, sendo avaliado: CD4-PE e CFSE. Figura A demonstra os histograma referente a porcentagem de proliferação das células CD4 na ausência ou presença de 1MT. B) Pseudo-color plots ilustram o número de proliferações das células CD4 junto à porcentagem de células em

4.4 Inibição da IDO in vivo Exacerba a Encefalomielite Experimental Auto-imune

A fim de se descobrir se tais efeitos possuíriam uma relevância clínica, bloqueiamos a IDO no modelo de auto-imunidade do SNC a Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE). Para tanto utilizamos *pellets* sub-cutãneos de 1-MT, sendo que o grupo controle recebeu *pellets* com placebo. Como esperado, os camundongos implantados com *pellets* de 1-MT apresentaram uma EAE mais grave quando comparados aos animais do grupo controle. Além disso, vale ressaltar que esta diferença é observada desde o pico até o final da doença, entre 16°-22° dia pósimunização (Figura 16). Estes dados demonstram claramente a importância da atividade da IDO no controle da resposta imune.

Figura 16:

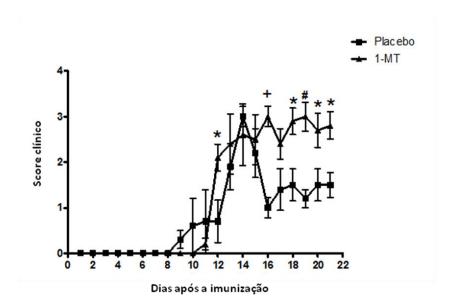


Figura 16. Inibição de IDO por pellets de 1-MT exacerba a pontuação dos sinais clínicos da EAE. Camundongos C57BL/ 6 implantados com pellets placebo ou de 1-MT, 24 horas mais tarde os mesmos foram imunizados com 150 mg de MOG_{35-55} de acordo com materiais e métodos. O score de doença foram avaliados diariamente. n = 6-8 camundongos por grupo. Two-way ANOVA. * P < 0.05, # p < 0.01, + p < 0.001.

4.4.1 Presença da IDO no SNC

Após demonstrarmos *in vitro* que as células da microglia são capazes de expressar IDO e que esta é efetiva no controle da proliferação dos linfócitos T, optamos por avaliar se o fenômeno se reproduz *in vivo*. Através da técnica de imunofluorescência podemos observar que a IDO é expressa tanto na região da medula espinal, quanto no cérebro dos animais com EAE (Figura 17 A-D). No entanto, para elucidar quais populações celulares expressam IDO no SNC durante a EAE, realizamos uma análise por citometria de fluxo das células mononucleares infiltrantes do SNC ao pico de EAE. De forma interessante, nossos resultados mostram que apenas cerca de 2% dos macrófagos (CD11b+CD45high) expressam IDO. Por outro lado, as céluals da microglia (CD11b+CD45low) expressam IDO em cerca de 12 % de sua população (Figura 17 F). Curiosamente, nossos dados apontam para as célula da microglia como aquelas responsáveis pela expressão de IDO.

Figura 17:

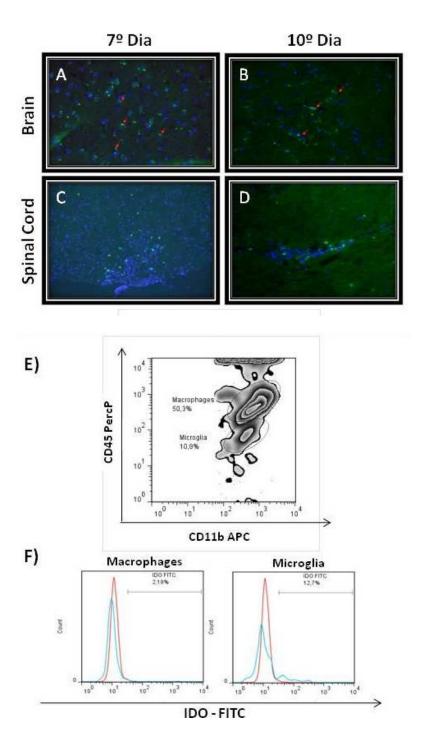


Figura 17. IDO é expressa no SNC de camundongos com EAE. Camundongos C57BL/6 foram imunizados com MOG₃₅₋₅₅ de acordo com os materiais e métodos. Durante o pico da doença os camundongos foram sacrificados e seu sistema nervoso central submetidos ao protocolo para imunofluorescência (A-D) e citometria de fluxo (E-F) para avaliação da expressão de IDO. Figura (E) demonstra as porcentagens das células da microglia e macrófagos extraídos do SNC de animais com EAE. Em F) histogramas mostram expressão IDO por ambas as populações.

4.4.2 Células CD4 2D2 Específicas para MOG₃₅₋₅₅ Proliferam no SNC

Até o momento, demonstramos que as células da microglia são capazes de suprimir a proliferação de células T in vitro através de mecanismos depletores de triptofano. Em seguida, decidimos avaliar se células CD4 encefalitogênicas (provenientes de animais 2D2) sofreriam alguma ação da IDO dentro do SNC. Para tanto, células T CD4⁺ de animais 2D2 foram estimuladas in vitro e transferidas para camundongos *naive*. Conforme descrito nos materiais e métodos, 1x10⁶ células foram marcadas com CFSE e transferidas por via i.v. a cada camundongo, os quais foram previamente implantado com *pellets* placebo ou de 1-MT um dia antes. Após sete dias, o SNC destes animais foi processado, as células mononucleares infiltrantes extraídas e submetidas a análise por citometria de fluxo para CD4 e CFSE. Como ilustrado pela figura 18A, há uma maior frequência de células T CD4 no sistema nervoso central dos camundongos implantados com 1-MT. Além disso, na figura 18B, vemos um maior percentual de proliferação nessa mesma população. O histograma também mostra uma média de intensidade de fluorescência de CFSE reduzida nas células CD4 dos camundongos tratados com 1-MT, demonstrando um maior índice de proliferação.

Figura 18:

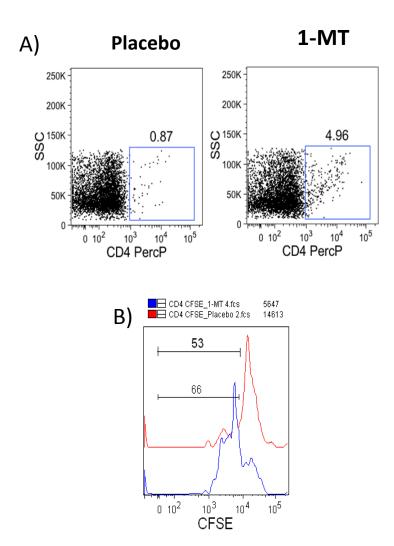


Figura 18. IDO inibe a proliferação de células CD4⁺ específicas para MOG₃₅₋₅₅ no sistema nervoso central. Esplenócitos totais de camundongos 2D2 foram plaqueados e estimulados *in vitro*, conforme descrito no materiais e métodos. Sete dias após a transferência, as células CD4⁺ 2D2 específicas para MOG₃₅₋₅₅ foram isoladas e marcadas com CFSE . 1x10⁶ células CD4 2D2 foram injetadas por i.v. em camundongos C57BL/6. Tais animais receberam *pellets* com placebo ou 1-MT. Após sete dias, as células mononucleares que infiltraram o sistema nervoso central foram extraídas e submetidas à análise de citometria de fluxo. Em A), os *gates* ilustram a frequência de células CD4⁺. Na figura B), histogramas mostram a porcentagem de células T CD4 que sofreram proliferação celular. n = 5.

5. DISCUSSÃO:

A neuroimunologia ou neuroimunomodulação tem ganhado cada vez mais espaço tanto na pesquisa básica como clínica. Isso devido ao fato de que só recentemente alguns fenômenos começaram a ser compreendidos e estudados. Isso a despeito do fato de que há muito tempo, especulava-se que o sistema nervoso poderia exercer um papel ativo sobre a resposta imune em geral. De fato, Galeno a 200 a.C. já descrevia que mulheres "melancólicas" apresentavam uma maior propensão ao desenvolvimento de tumores mamários, do que aquelas chamadas "sanguíneas", como revisto (Dunn, 1995). Além disso, Aristóteles já afirmava que mudanças na "psique" repercutiam em alterações estruturais e fisiológicas no indivíduo. Atualmente os estudos têm ficado cada vez mais refinados, resultando na descrição de mecanismos importantes de modulação da resposta imune pelo sistema nervoso central, periférico ou entérico, como revisto (Olofsson et al., 2012).

De fato os primeiros relatos experimentais sobre esta interação começou em 1936 quando Hans Selye propôs a Síndrome Adaptativa Generalizada (do inglês; General Adaptive Syndrome), a qual hoje sabemos ser orquestrada pela ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA). Em 1986, iniciaram-se os primeiros experimentos que comprovaram a expressão de receptores prioritários do SNC em células do SI. Exemplos destes são os adrenoceptores, principalmente do tipo β2, presentes em linfócitos T CD4 e CD8, macrófagos, células dendríticas e mesmo células NK, (Fuchs et al., 1988). A presença destes receptores torna possível a atuação de uma série de moléculas que geralmente são restritas às células neuronais, como neurotransmissores e neuropeptídeo; incluindo a epinefrina (E), noraepinefrina (NE), dopamina (DA),

acetilcolina (Ach), hormônio de crescimento (GH) e opióides endógenos. Os efeitos desta interação podem ser os mais variáveis, sendo capazes de induzir supressão, ativação, ou mesmo atuarem na ontogenia de determinadas populações celulares, como no caso de células NK (Gan et al., 2002). Dando continuidade aos estudos, Levite et al. (2000), demonstrou que neuromoduladores (somatostatina, neuropeptídeo Y, substância P e dopamina) podem interagir diretamente com as células T e proporcionar-lhes estímulos tanto positivos (pró-adesivos com ativação de integrinas,) quanto negativos (anti-adesivo com inibidores de integrina). Além destes efeitos, o autor demonstra que os neuromoduladores citados acima promovem uma interação direta com seus receptores guiando a resposta de células T (Th0, Th1, Th2) através da secreção de IFN-γ ou IL-4. A integração do SNC com o SI tem estado cada vez mais presentes nas discussões científicas (Peron et al., 2012; Rothwell , 1995; Turrin; Rivest, 2004). Seja na atuação de outros neuromoduladores sobre a resposta imune ou a atuação das células imunes perante o sistema nervoso.

Exemplos dessa intereção ocorrem nas principais doenças neurais de nossa década: Doença de Alzheimer, parkinson, depressão e esclerose múltipla, onde todas apresentam um papel fundamental do SI, atuando na manutenção da homeostasia ou auxiliando na patologia da doença (Davalos et al., 2005; Qian; Flood, 2008; Murphy et al., 2010).

As células da microglia são considerados os macrófagos residentes no SN, sendo assim as principais células da resposta imune inata local. Dependendo dos estimulos envolvidos, as células da microglia podem atuar de maneira patológica, promovendo a neuroinflamação ou neurodegeneração, ou também desempenhar um papel regulador, promovendo regeneração tecidual (Czeh et al., 2011), clearence de células mortas,

citoproteção neuronal ou imunosupressão. Tais divergências são provenientes da gama de fatores produzidos durante o processo inflamatório local, como o GM-CSF, TGF-β, IL-1, IL-10, IL-18, IFN-γ, prostaglandina E2 entre muitos outros. Como resposta a estes estímulos, a microglia passa a expressar citocinas tanto de perfil pró-inflamatório quanto ainti-inflamatório. De fato, assim como para macrófagos, já se aceita uma divisão funcional para estas céluals, sendo divididas em microglia 1 (perfil pró-inflamatório com produção de TNF-α, IL-1β e IL-6, matrix metaloproinases e óxido nítrico) quando estimuladas com LPS, IFN-γ, IL-6, IL-12, e microglia 2 (anti-inflamatório com produção de IL-10, arginase-1 (Arg1) e Chitinase 3-like 3 (Ym1)) quando na presença de IL-4, IL-13 e TGF-β (Mosser; Edwards, 2008; Zhou et al., 2012).

As diferenças entre estas subpopulações acarretam em uma resposta completamente diferente uma da outra. A subpopulação M1 é a mais caracteristica possuindo maior descrição sobre sua ação no SNC, principalmente envolvendo o aumento da resposta inflamatória a qual pode resultar em morte neuronal. Dentre os diversos modelos de estudo temos sua influência observada no Parkinson (Pabon etal., 2011), Alzheimer (Cameron; Landreth, 2010) e Esclerose múltipla (Gao; Tsirka, 2011). Vale ressaltar que durante o passar da vida as células da microglia passam a apresntar uma caracteristica mais pró-inflamatória seguida de uma diminuição de sua capacidade fagocítica, contribuindo para o desenvolvimento de patologias como Parkinson e Alzheimer (Wong, 2013).

Grande parte da participação patológica da microglia esta na sua relação com os linfócitos T que infiltram o SNC. Durante seu estado quiescente a microglia possui baixa ou nula expressão de CD80, CD86, CD40 e CD45 que, no entanto, podem vir a

ser superexpressas quando na presença de estímulos inflamatórios, como observado em nossos resultados. Junto a estas é descrito um aumento nos níveis de MHC-II o que em conjunto com as demais molécuas favorece sua ação de apresentadora de antígenos (Graeber; Streit, 2010).

Além das moléculas co-estimuladoras, a ativação da microglia resulta no aumento da sintese de TNF-α o qual aumenta a inflamação através da ativação de astrócitos e induz mudanças nas moléculas de adesão do endotélio facilitando a migração de células da periferia para o SNC. Junto a este é descrito também o aumento da IL-1β e IL-23, condizente com os nossos resultados, o que pode indicar uma relação direta desta população com a manutenção de células Th17 encefalitogênicas que infiltram o SNC (Zhou et al., 2012).

De fato, sabe-se que linfócitos T possuem uma ampla ação sobre as células da microglia. Dentre os principais estímulos envolvidos nessa interação esta a IL-17, capaz de induzir a síntese de IL-6, IL-1β, TNF e GM-CSF (Petermann; Korn, 2011). Este último tem a capacidade de promover o aumento da expressão das moléculas de MHC-I e de moléculas co-estimuladoras, além de induzir a síntese de IL-6 e IL-23 levando à um aumento contínuo na inflamação local (Petermann; Korn, 2011). Em 2007 Ponomarev et al., demonstrou a importância do GM-CSF sobre a microglia. Através de experimentos com quimeras onde os animais ora possuíam as células periféricas deficientes para GM-CSF, ora as células residentes do SNC, ficou claro que que apenas células da microglia possuíam real necessidade para este fator de crescimento e que sua ausência perante este grupo de células diminuia quase que por completo os sinais clínicos da EAE.

Ainda que as ações da microglia durante o processo neuroinflamatório sejam indiscutíveis não se pode restringir os efeitos da patologia apenas a esta. De fato a resposta inflamatória desencadeada pelos linfócitos atuam sobre todas as células residentes do SNC (Zepp et al., 2011), principalmente astrócitos, cujas ações estão a ser cada vez mais estudadas (Kang et al., 2010). Ao lembrar que este grupo celular corresponde a 80% das células do SNC, é de se imaginar que o mesmo possua influência na neuroinflamação. De forma interessante, Kang et al. (2010) demonstraram que a sinalização de IL-17, a qual utiliza a proteína adaptadora Act1, uma proteína da família das SEFIR (Sequências homologas das regiões citoplasmáticas dos receptores da familia IL-17), promove ativação da via de sinalização culminando na ativação do NF-kB. Tal sinalização tem papel fundamental para ativação do astrócito, o qual após estímulo promove aumento de CXCL1, CXCL2, CCL20, CD40 e MHC-II, além de matrizmetaloproteinases (Kang et al., 2010; Dong; Benveniste 2001)

Embora Kang et al. (2010) tenham demonstrado que os astrócitos participam ativamente da resposta inflamatória da EAE e que o bloqueio da Act1 nessas células diminui os sinais clínicos da doença, estudos posteriores em que ocorre a depleção de astrócitos ativos (depleção ocorre 7 dias após inicio da EAE) mostram um maior infiltrado de células mielóides no SNC, sendo estas responsáveis por promover uma doença mais grave (Toft-Hansen et al., 2011). Corroborando tal achado Hindinger et al. (2012) demonstraram que o bloqueio da sinalização de IFN-γ em astrócitos aumenta a gravidade da EAE. Isso porque ao diminuir a sinalização ocorre aumento na expressão do RNA de moléculas pró-inflamatórias no SNC (IL-1, TNF e CCL5), além de um aumento na expressão de CCL2, CCl5 CXCL10, iNOS e TNF pelos próprios astrócitos.

Neste sentido procuramos estudar mecanismos pelos quais as células da microglia pudessem atuar no controle da resposta inflamatória local durante a EAE. Dentre as propostas, uma das possibilidades seria avaliar a atividade de IDO, sabidamente um potente supressor da resposta imune adaptativa (Baban et al., 2009). Haja vista que células com intensa atividade de síntese protéica necessitam de aminoácidos como substrato, demonstrou-se que, a atividade da IDO na quebra do triptofano em quinureninas é capaz de inibir a proliferação de células T, tanto in vivo como in vitro, além de ser capaz de gerar células T reguladoras (Fallarino et al., 2006). Sendo assim procuramos avaliar se o mesmo ocorreria atravéz das células da microglia. De fato a expressão da IDO por células da microglia ja havia sido demonstrada na literatura, (Kwidzinski et al., 2005), porém sem avaliar seu papel funcional.

Os mecanismos pelos quais a IDO supressão estão sendo cada vez mais discutidos. Entre eles, o mais aceito, é a via de ativação de uma via de stress celular, dependente de quinases denominadas GCN2K e CHOP. De forma elegante, demonstrou-se que células T ativadas de animais deficientes para essas quinases são refratárias à atividade de IDO, assim como à ausência de triptofano no meio extra-celular (Munn et al., 2005). Vale ressaltar que um artigo publicado na science demonstrou que a halofuginona, uma droga capaz de ativar a via de GCN2K e CHOP é capaz de reduzir a diferenciação de células ThO para Th17 (Mark et al., 2009).

Nossos dados demonstram que a expressão de IDO não depende de rmIFN-γ, podendo ocorrer na presença de LPS. De fato, tal dado é corroborado pela literatura, a qual demonstra que a expressão de IDO por células da microglia é independente de IFN-γ, tendo sua ativação pela via da JNK (c-Jun Kinase) (Wang et al. 2010). Ainda mais interessante é o fato que a ativação por LPS mantém a função supressora da IDO

sobre as células T efetoras MOG35-55 específicas. Neste sentido, vale mencionar que a expressão TLR-4 por células da microglia esta relacionado com a indução da EAE (Racke et al., 2005). Assim, é possível que ativação de TLR-4 em células da microglia induza a expressão IDO in vivo. Com isso, sugerimos que a expressão de IDO por células da microglia podem ser desencadeadas por pelo menos dois mecanismos distintos : I) o encontro com células Th1 secretoras de IFN-γ ou II) pela ativação do TLR-4 através dos PAMPs (do inglês, Pathogen Associated Molecular Patterns) utilizados no momento da imunização com o antígeno, tais como a toxina de Bordetella pertussis (Racke et al., 2005) e o CFA (do inglês, Complete Freund Adjuvant). Sendo assim, podemos perceber que, fora sua potente capacidade pró-inflamatória, as células da microglia também lançam mão de mecanismos supressores no intuito de impedir o descontrole do processo inflamatório local, o qual de fato repercute em fenômenos bastante deletérios, como a morte neuronal e principalmente de oligodendrócitos (Ransohoff; Perry, 2009)

Ao percebermos a ativação deste mecanismo em céluals da microglia, somado ao fato de que animais tratados com o inibidor de IDO, o 1-MT, possui uma EAE mais grave, iniciamos experimentos com intuito de melhor compreender os mecanismos envolvidos na expressão de IDO por células da microglia. Embora já tenha sido demonstrada que a IDO é expressa no SNC durante a EAE (Kwidzinski et al., 2005), sua repercussão biológica sobre as células imunes infiltrantes ainda não foram elucidados. Nossos resultados demonstram que não só ocorre a expressão de IDO durante a EAE, mas também que as células da microglia são as que mais expressam esta enzima quanto comparadas com outras células presentes na lesão, como macrófagos infiltrantes CD11b+CD45high. De fato, atualmente se sabe que células do SNC

(astrócitos, neurônios e células endoteliais) também podem expressar a IDO ao serem ativadas, no entanto estas não são capazes de reproduzir a via completa das quinureninas (Guillemin et al., 2004).

Ainda que evidenciado tais efeitos da IDO na patologia, resta a dúvida se esta ação é decorrente de uma resposta periférica ou local. Através do modelo passivo de EAE, induzido pela transferência de células T encefalitogênicas MOG35-55 específicas à camundongos naive, observamos que camundongos implantados com o inibidor de apresentaram uma maior porcentagem de células CD4+ infiltrantes quando comparados ao grupo placebo. Além disso, essas células eram mais proliferativas, apresentando uma maior diluição do CFSE. Este resultados não só indicam que as células transferidas são capazes de proliferar dentro do SNC dos camundongos receptores, como também são alvos da ação da IDO in situ. Pode-se argumentar que esta proliferação ocorreu em órgãos periféricos, como baço ou linfonodos drenantes e, portanto, ser alvo da expressão da IDO pelas células dendríticas ou macrófagos, como um evento prévio à infiltração do SNC. No entanto, a transferência de células T antígeno específicas restringe a proliferação das mesmas ao órgão-alvo. Neste caso, como o peptídeo MOG35-55 é expresso apenas por células do SN, ou seja, oligodendrócitos, é improvável que a proliferação ocorra em outro lugar além do cérebro ou medula espinal. Outro fato que corrobora tal hipótese é a deficiente drenagem linfática do cérebro e medula, sendo pouco aceito que os linfonodos cervicais profundos desempenhem tal papel. Para nós, fica claro que a proliferação antígeno-específica das células T é modulada pela expressão da IDO in situ a partir de células da microglia, e este pode ser um mecanismo inato importante para em impedir uma exacerbação da resposta imune local durante a neuroinflamação.

Ainda que os efeitos imunosupresores da IDO se destaquem durante a EAE, mecanismos de ação dos subprodutos de sua via, como o ácido quinolínico (QUIN) e o ácido quinurênico (KYNA) sobre o SNC estão sendo amplamente investigados (Myint; Kim, 2003; Guillemin et al., 2004; Braidy et al., 2011). Isto devido ao fato de que essas moléculas podem se ligar ao receptor ionotrópico do glutamato NMDA (Myint, Kim, 2003). A relevância disto é que, como ressaltado anteriormente, o NMDAr é expresso não só por neurônios, mas também por várias células do sistema imune, tais como linfócitos T (Ganor et al., 2003), macrófagos e células dendríticas (Pacheco et al. 2006). Na verdade, o papel de NMDAr em células do sistema imune ainda é pouco abordado, sendo este uma das metas em nosso laboratório.

Todavia, nem sempre os efeitos das quinureninas serão benéficos (Kwidzinski; Bechmann, 2007), de fato cada vez mais artigos trazem como objetivo o bloqueio da ação da IDO em doenças neurológicas. Isso acontece, pois a ligação dos subprodutos das quinureninas (ácido quinurênico) pode aumentar a ação do glutamato favorecendo sua ação neurotóxica, como já descrito em estudos com Alzheimer, Parkinson e convulsões (Guillemin et al., 2005; Qian; Flood, 2008; Anderson; Rodriguez, 2011). Outro ponto a ser observado é que a intensa clivagem do triptofano pela IDO pode impedir o desenvolvimento da via da serotonina e melatonina ocasionando doenças como a depressão, haja vista que tal aminoácido é o precursor limitante para a síntese desses neurotransmissores (Oxenkrug, 2010).

Além de sua capacidade de se ligar em receptores de glutamato, foi recentemente demonstrado que as quinureninas podem também auxiliar no desenvolvimento de células tumorais (Godin-Ethier et al., 2011). Essa ação ocorre através da ativação do fator de transcrição Ahr (do inglês Aryl Hydrocarbon Receptor). Este fator atua sobre

seu gene alvo o CYP1A1 em células tumorais aumentando a sobrevida e malignidade da mesma. Além disso o Ahr atua sobre o TIPARP presente em linfócitos T CD8 e células NK, dimiuindo sua ação citotóxica e capacidade proliferativa dessas células (Opitz et al., 2011). Contudo os efeitos promovidos pelas quinureninas sobre o Ahr não se resumem apenas ao câncer. Quintana et al. (2008) demonstrou que tal fator de transcrição esta altamente relacionado no direcionamento da resposta de linfócitos para Th17 ou Treg, sendo este relatado como chave central desse processo (Nguyen et al.,2010) uma vez que depende do ligante utilizado. Corroborando tais dados, Apetoh et al. (2010) mostrou que o Ahr se liga ao fator de transcrição c-Maf e induz a diferenciação de linfócitos T reguladores Tr1, e assim melhorando os achados clínicos em modelo de colite (Singh et al., 2011). Tais achados contribuem para uma melhor compreensão deste circuito complexo que é eixo triptofano-quinureninas, evidenciando também o pleiotropismo dos metabólitos do triptofano, assim como a promiscuidade dos receptores de glutamato, como demonstrado no esquema abaixo.

Em suma, temos que a IDO expressa pelas células da microglia promove a supressão da proliferação dos linfócitos T específicos para antígenos de mielina, sendo esta ação desempenhada por 3 mecanismos básicos: I) Depleção do triptofano que leva ao acúmulo do t-RNA deste aminoácido em linfócitos T e consequente ativação da via de stress GCN2K; II) a falta do triptofano diminui os níveis de serotonina o que leva a diminuição do priming dos linfócitos naive e; III) as quinureninas agem sobre o Ahr promovendo a diferenciação dos linfócitos t em Tregs e estas atuam sobre os linfócitos T patogênicos impedindo a proliferação dos mesmos. Nossos resultados apontam para um potencial supressor presente numa população residente do SNC, mais especifiamente as células da microglia que, agindo de tal forma tenta limitar os ativação

de clones encefalitogênicos e assim tentar reduzir o processo inflamatório local e suas possíveis ações deletérias.

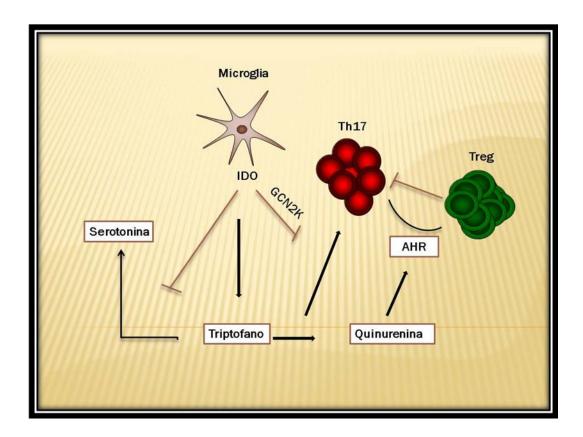


Figura 19. Mecanismos de supressão desempenhados pela IDO.

Ainda que a tendencia atual seja a demonstração da ação negativa da IDO, nosso trabalho venho demonstrar que em relação a neuropatologias autoimunes, o controle feito pela IDO se sobre põe aos riscos de neurotoxicidade produzida por seus metabolitos. O que sugere novas estratégias de sua modulação nesse modelo experimental.

6. CONCLUSÕES

- As células de linhagem de microglia, C8-B4 expressam a enzima IDO de forma funcional, sendo capaz de suprimir a proliferação de linfócitos T específicos para o epítopo de mielina MOG₃₅₋₅₅ in vitro;
- Culturas primárias de células da microglia obtidas de animais adultos também apresentaram o mesmo perfil supressor;
- Clones de linfócitos T CD4 específicos para MOG₃₅₋₅₅ são capazes de proliferar dentro do SNC, como evidenciado pela análise da diluição de CFSE in vivo;
- Além disso, esses clones apresentam um maior índice de proliferação quando transferidos aos animais tratados com o inibidor de IDO, 1-MT, evidenciando o papel funcional da IDO em células da microglia *in vivo*.

7. BIBLIOGRAFIA:

ABEM - Associação Brasileira de Esclerose Multipla [on-line] [citado 15 fev. 2009]. Disponível em: http://www.abem.org.br.

Acosta-Rodriguez EV, NG, Lanzavechia A, Sallusto F. Interleukins 1b and 6 but not transforming growth factor-b are essential for the differentiation of interleukin 17–producing human T helper cells. REVISTA. 2007; 8: p. 942-950.

Almolda B, G.B., Castellano B., Antigen presentation in EAE: role of microglia, macrophages and dendritic cells. Front Biosci. 2011; 16: p. 1157-71.

Alt C, LM, Engelhardt B. Functional expression of the lymphoid chemokines CCL19 (ELC) and CCL 21 (SLC) at the blood-brain barrier suggests their involvement in G-proteindependent lymphocyte recruitment into the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. Eur J Immunol. 2002; 32: p. 2133-2144.

Anderson G., Rodriguez M. Multiple sclerosis, seizures, and antiepileptics: role of IL-18, IDO, and melatonin. European Journal of Neurology. 2011; 18: p.680–685.

Baban B, Chandler PR, Sharma MD, Pihkala J, Koni PA, Munn DH, Mellor AL. IDO Activates Regulatory T Cells and Blocks Their Conversion into Th17-Like T Cells. J Immunol. 2009; 183: p.2475-2483.

Bailey SL, SB, Macmahon EJ. CNS Myeloid DCs presenting endogenous myelin peptides prefferentially polarize CD4⁺ Th17 cells in relapsing EAE. Nat Immunol. 2007; 8: p.172-180.

Ball H, Yuasa 1 H, Austin CJD, Weiser S, Hunt N H. Indoleamine 2,3-dioxygenase-2; a new enzyme in the kynurenine pathway. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2009; 41: p.467–471.

Baxter AG. The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. Nat Med. 2007; **7**: p.904-12.

Beers DR, H.J., Xiao Q, Zhao W, Wang J, Yen AA, Siklos L,McKercher SR, Appel SH. Wild-type microglia extend survival in PU.1 knockout mice with familial amyotrophic lateral sclerosis. Proc Natl Acad Sci Usa. 2006; 103: p.16021-026.

Bettelli E, Yijun C, Wenda, Korn T, Strom T, Oukka M, Weiner HL, & Kuchroo V. Reciprocal development pathways for the generation of pathogenic effector Th17 and regulatory T cells. Nature. 2006; 441: p.235-238.

Brandacher G, Margreiter R,Fuchs D. Clinical relevance of indoleamine 2,3-dioxygenase for alloimmunity and transplantation. Current Opinion in Organ Transplantation . 2008; 13: p.10–15.

Braidy N, Guillemin GJ, Mansour H, Chan-Ling T, Grant R. Changes in kynurenine pathway metabolism in the brain, liver and kidney of aged female Wistar rats. FEBS J. 2011; 278: p.4425-34.

Bronner G, Elran E, Golomb J, Korczyn A D. Female sexuality in multiple sclerosis: the multidimensional nature of the problem and the intervention. Acta Neurol Scand. 2010; 121: p.289-301.

Cameron B, Landreth GE. Inflammation, Microglia and Alzheimer's Disease. Neurobiol Dis. 2010; 37: p.503–509.

Chen M, Chen G, Deng S, Liu X, Hutton GJ, Hong J. IFN-β induces the proliferation of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells through upregulation of GITRL on dendritic cells in the treatment of multiple sclerosis. J Neuroimmunol. 2011; 242:39-46.

Chu CQ, WS, Dalton DK. Failure to suppress the expansion of the activated CD4 T cell population in interferon gamma-deficient mice leads to exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis. J Exp Med. 2000; 192: p.123-128.

Clausen BH, Lambertsen KL, Babcock AA. Interleukin-1β and tumor necrosis factor-α are expressed by different subsets of microglia and macrophages after ischemicstroke in mice. J Neuroinflammation. 2008; 5: p.46.

Cua DJ, SJ, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, Lucian L, To W, Kwan S, Churakova T, Wiekowski S, Lira S, Gormank SA, Kasteleink RA Sedgwick JD. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. Nature. 2003; 421: p.744-748.

Curti A, P.S., Valzasina B, Aluigi M, Isidori A, Ferri E, Salvestrini V, Bonanno G, Rutella S, Durelli I, Horestein AL, Fiore F, Massaia M, Colombo MP, Baccaranni M, Lemoli RM. Modulation of tryptophan catabolism by human leukemic cells results in the conversion of CD25- into CD25+ regulatory cells. Blood. 2007; 109: p.2871-2877.

Czeh M, Gressens P, Kaindl AM. The yin and yang of microglia. Dev Neurosci. 2011; 33: p.199-209.

Dardalhon V, Korn T, Kuchroo VK, Anderson AC. Role of Th1 and Th17 cells in organ-specific autoimmunity. Journal of Autoimmunity. 2008; 31: p.252–256

Das Sarma J, CB, Marek R, Sadhukhan S, Caruso ML, Shafagh J, Fitzgerald DC, Shindler KS, Rostami A. Functional interleukin-17 receptor A is expressed in central

nervous system glia and upregulated in experimental autoimmune encephalomyelitis. J Neuroinfllammation. 2009; 6: p.1-12

Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. Nat. Neurosci 2005; 8: p.752–58.

David Munn, SM, Babac Baban, Harding HP, Zhang Y, Ron D, Andrew L. Mellor. GCN2 Kinase in T Cells Mediates Proliferative Arrest and Anergy Induction in Response to Indoleamine 2,3-Dioxygenase. Immunity. 2005; 22: p. 633-642.

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: p. e15531.

Dong Y, Benveniste E. Immune Function of Astrocytes. GLIA. 2001; 36: p.180–190.

Dunn AJ. 1995. Interactions between the nervous system and the immune system: implications for psychopharmacology. In: BLOOM, FEK., DJ. (Ed.), Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress. Raven-Press, New York, pp. 719-731.

Fallarino F, UG, You S, Macgrath BC, Cavener DR, Vacca C, Orabonna C, Bianchi R, Belladonna ML, Volpi C, Santamaria P, Fioretti MC, Puccetti P. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zetachain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. J Immunol. 2006;176: p.6752-61

Farina C, KM, Giese T, Aloisi F, Meinl E. Preferential expression and function of TLR3 in human astrocytes. J Neuroimmunol. 2005; 159: p.12-19

Floden AM, Li S, Combs C K. β -Amyloid-Stimulated Microglia Induce Neuron Death via Synergistic Stimulation of Tumor Necrosis Factor α and NMDA Receptors. The Journal of Neuroscience. 2005; 25: p.2566 –2575.

Friese MA, MX, Willcox N, Bell JI, Martin R, Fuger L. The value of animal models for drug development in multiple sclerosis. Brain. 2006; 129: p.1940-1952.

Fuchs BA, Albright JW, Albright JF. h-adrenergic receptors on murine lymphocytes: density varies with cell maturity and lymphocyte subtype and is decreased after antigen administration. Cell. Immunol. 1988; 243: p.495–508.

Gao Z, Tsirka SE. Animal Models of MS Reveal Multiple Roles of Microglia in Disease Pathogenesis. Neurol Res Int. 2011; 2011: p.383087

Gama Lucio. Mudanças em subgrupos de monócitos durante infecção aguda por vírus da imunodeficiência símia (siv); Expansão de uma população inédita de células CD14+CD16- com fenótipo atípico CCR2- [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo. 2011

Gan X, Zhang L, Solomon GF, Bonavida B. Mechanism of norepinephrine-mediated inhibition of human NK cytotoxic functions: inhibition of cytokine secretion, target binding, and programming for cytotoxicity. Brain Behav. Immun. 2002; 16: p.227–246.

Ganor Y, BM, Ben-Zakay N, Unger T, Levite M. Human T cells express a functional ionotropic glutamate receptor GluR3, and glutamate by itself triggers integrin-mediated adhesion to laminin and fibronectin and chemotactic migration. J Immunol. 2003; 170: p.4362-4372.

Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. Science. 2010; 330: p.841–845.

Godin-Ethier J, Hanafi LA, Piccirillo CA, Lapointe R. Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human cancers: clinical and immunologic perspectives. Clin Cancer Res. 2011; 15: p.6985-91.

Governan J, P.A., Huseby ES. The role of CD8(+) T cells in multiple sclerosis and its animal models. Curr Drug Targets Inflamm Allergy. 2005; 4: p.239-245.

Graeber MB, Streit WJ. Microglia: biology and pathology. Acta Neuropathol. 2010; 119: p.89–105.

Grzesiuk, Kuntz A. Características clínicas e epidemiológicas de 20 pacientes portadores de esclerose múltipla acompanhados em Cuiabá - Mato Grosso. Arq. Neuro-Psiquiatr. 2006; 64: 635-8.

Guillemin GJ, Brew BJ, Noonan CE, Takikawa O, Cullen KM. Indoleamine 2,3 dioxygenase and quinolinic acid immunoreactivity in Alzheimer's disease hippocampus. Neuropathol Appl Neurobiol. 2005; 31: p.395-404.

Guillemin G, Smythe G, Takikawa O, Brew BJ. Expression of Indoleamine 2,3-Dioxygenase and Production of Quinolinic Acid by Human Microglia, Astrocytes, and Neurons. GLIA. 2004; 49: p.15–23.

Hémar A, Mulle C. Alzheimer's disease, amyloid peptide and synaptic dysfunction. Med Sci. 2011; 27: p.733-6.

Hindinger C, Bergmann CC, Hinton DR, Phares TW, Parra GI, Hussain HS, Savarin C, Atkinson RD, Stohlman SA. IFN-γ Signaling to Astrocytes Protects from Autoimmune Mediated Neurological Disability. PLoS One. 2012; 7: p.e42088.

Holmes C, Boche D, Wilkinson D, Yadegarfar G, Hopkins V, et al. Long-term effects of Aβ42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebocontrolled phase I trial. Lancet. 2008; 372: p.216–23

Huang Y, Zhao L, Jia B, Wu L, Li Y, Curthoys N, Zheng JC.. Glutaminase Dysregulation in HIV-1-Infected Human MicrogliaMediates Neurotoxicity: Relevant to HIV-1-Associated Neurocognitive Disorders. The Journal of Neuroscience. 2011; 31: p.15195–15204.

Ireland S, Monson N.Potential impact of B cells on T cell function in multiple sclerosis. Mult Scler Int. 2011; 2011: p.423971.

Ivanov I, DG, Littman DR. Lymphoid tissue inducer cells in intestinal immunity. CuRr Top Microbiol Immunol. 2006; 308: p.59-82.

Ivanov I, MB, Zhou B, Tadokoro CE, Leppeley A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR. The Orphan Nuclear Receptor RORgt Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17+ T Helper Cells. Cell. 2006; 126: p.1121-1133.

Jones LS, RL, Agarwal RK, Tarrant TK, Chan CC, Wiggert B, Caspi R. IFN-gamma-deficient mice develop experimental autoimmune uveitis in the context of a deviant effector response. J Immunol. 1997; 15: p.5997-605.

Kang Z, Altuntas CZ, Gulen MF, Liu C, Giltiay N, Qin H, Liu L, Qian W, Ransohoff RM, Bergmann C, Stohlman S, Tuohy VK, Li X. Astrocyte-restricted ablation of interleukin-17-induced Act1-mediated signaling ameliorates autoimmune encephalomyelitis. Immunity. 2010; 32: p.414–425

Korn T, EB, Wenda Gao, Awasthi A, Jager A, Strom TB, Oukka M, Kuchroo VK. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflamatory Th17 cells. Nature. 2007; 448: p.484-487.

Koizumi S, Shigemoto-Mogami Y, Nasu-Tada K, Shinozaki Y, Ohsawa K, et al. UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis. Nature. 2007; 446: p.1091–95.

Kwidzinski E, BJ, Aktas O, Richter D, Mutlu L, Zipp F, Nitsch R, Bechmann I. Indolamine 2,3-dioxygenase is expressed in the CNS and down-regulates autoimmune inflammation. FASEB J. 2005; 19: p.1347-9.

Kwidzinski E, Bechmann I. IDO expression in the brain: a double-edged sword J Mol Med. 2007; 85: p.1351–1359.

Levite M. Nerve driven immunity: the direct effects of neuro-transmitters on T-cell function. New York Acad. Sci. 2000; 917: p.307–321.

Levite M. Autoimmune epilepsy. Nat. Immunol. 2002; 3: p.500.

Li MO, Flavell R. Contextual Regulation of Inflammation: A Duet by Transforming Growth Factor-b and Interleukin-10. Immunity. 2008; 28: p.467-476.

Lima EP, Haase VG, Lana-Peixoto MA. Heterogeneidade neuropsicológica na esclerose múlipla. Psicol. Reflex. Crit. 2008; 21: p.100-109.

MacFarland HF, MR. Multiple Scerosis: A complicated picture of autoimmunity. Nat Immunol. 2007; 8: p.913-919.

Mark S. Sundrud, SBK, Feuerer M, Dinis PC, Aimee EK, Rhule-Smith, Lefebvre ER, Unutmaz D, Mazitschek R, Waldner H, Whitman M, Keller T, Rao A. Halofuginone

Inhibits TH17 Cell Differentiation by Activating the Amino Acid Starvation Response. Science. 2009; 324: p.1334-1338.

McKercher SR, T.B., Anderson KL, Henkel GW, Vestal DJ, Baribault H, Klemsz M, Feeney AJ, Wu GE, Paige CJ, Maki RA., Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. EMBO J. 1996; 15: p.5647-5658.

Mellor AL, C.P., Marshall B, Jhaver K, Hansen A, Koni PA, Iwashima M, David H. Munn. Induced Indoleamine -2,3- Dioxygenase expression in dendritic cell subsets suppresses T cell clonal expansion. J Immunol. 2003; 171: p.1652-1655.

Mellor AL, S.J., Chandler P, Smith K, Molina H, Mao D, Munn DH. Prevention of T cell-driven complement activation and inflammation by tryptophan catabolism during pregnancy. Nat Immunol. 2001; 2: p.64-68.

Mins S, K.-S.P., Lee J, Kim K, Jung Y, Koh H, Do J, Kim H. Induction of IL-10-producing CD4+CD25+ T cells in animal model of collagen-induced arthritis by oral administration of type II collagen. Arthritis Res Ther. 2004; 6: p.213-219.

Moffett R, Namboodiri M A. Tryptophan and the immune response. Immunology and Cell Biology. 2003; 81: p.247–265

Monier A, Evrard P, Gressens P, Verney C. Distribution and differentiation of microglia in the human encephalon during the first two trimesters of gestation. J Comp Neurol. 2006; 499: p.565–582.

Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. Nat Rev Immunol. 2008; 8: p.958–969.

Muller M, Terry R, Miller SD, Getts DR. Current Theories for Multiple Sclerosis Pathogenesis and Treatment. In: Neuroinflammation: A Brave New World. In: Chan J. Autoimmune diseases-Contributing factors, specific cases of autoimmune diseases, and stem cell and other therapies. Rijeka: Intech; 2012. p.03-24.

Munn D, S.M., Babac Baban, Harding HP, Zhang Y, Ron D, Andrew L. Mellor. GCN2 Kinase in T Cells Mediates Proliferative Arrest and Anergy Induction in Response to Indoleamine 2,3-Dioxygenase. Immunity, 2005; 22: p.633-642.

Murphy AC, L.S., 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: p.641-51.

Myint AM, KY. Cytokine-serotonin interaction through IDO: a neurodegeneration hypothesis of depression. Med Hypotheses. 2003; 61: p.519-525

Okada Sabrina Sayori. Regulação cruzada entre peroxidases e indolamina 2,3 dioxigenase no controle da metabolização do triptofano [Tese]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo. 2010

Oksenberg Jr, Hauser SL. Genetics of multiple sclerosis. Neurol Clin. 2005; 1: p.61-75.

Olah M, Amor S, Brouwer N, Vinet J, Eggen B, Biber K, Boddeke HW. Identification of a microglia phenotype supportive of remyelination. Glia. 2011; 60: p.306-21.

Olofsson PS, R.BM, Levine YA, Tracey KJ., Rethinking inflammation: neural circuits in the regulation of immunity. Immunol Rev.2012; 248: p.188-204.

Opitz CA, Litzenburger UM, Sahm F, Ott M, Tritschler I, Trump S, Schumacher T, Jestaedt L, Schrenk D, Weller M, Jugold M, Guillemin GJ, Miller CL, Lutz C, Radlwimmer B, Lehmann I, Von Deimling A, Wick W, Platten M. An endogenous

tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. Nature. 2011; 478: p.197-203.

Oxenkrug GF. Tryptophan–Kynurenine Metabolism as a Common Mediator of Genetic and Environmental Impacts in Major Depressive Disorder: The Serotonin Hypothesis Revisited 40 Years Later. Isr J Psychiatry Relat Sci. 2010; 47: p.56–63.

Pabon MM, Bachstetter AD, Hudson CE, Gemma C, Bickford PC. CX3CL1 reduces neurotoxicity and microglial activation in a rat model of Parkinson's disease. J Neuroinflammation. 2011; 8: p.9

Pacheco R, O.H., Martinez-Navío JM, Climent N, Ciruela F, Gatell JM, Gallart T, Mallol J, Lluis C, Franco R., Glutamate released by dendritic cells as a novel modulator of T cell activation. J Immunol. 2006; 177: p.6695-6704.

Pang Y, Campbell L, Zheng B, et al. Lipopolysaccharide-activated microglia induce death of oligodendrocyte progenitor cells and impede their development. Neuroscience. 2010; 166: p.464–475.

Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, GiustettoM, Alves Ferreira T,Guiducci E,Dumas L, RagozzinoD,Gross CT. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. Science. 2011; 333: p.1456–1458. Peron JP, Oliveira D, Brandão WN, Fickinger A, Ligeiro de Oliveira AP, Rizzo LV, Câmara NOS. Central Nervous System Resident Cells in Neuroinflammation: A Brave New World. In: Chan J, Autoimmune diseases-Contributing factors, specific cases of autoimmune diseases, and stem cell and other therapies. Rijeka: Intech; 2012. p.173-192.

Peron JP, Yang K, Chen ML, Brandao WN, Basso AS, Commodaro AG, Weiner HL, Rizzo LV. Oral tolerance reduces Th17 cells as well as the overall inflammation in the central nervous system of EAE mice. J Neuroimmunol. 2010; 227: p.10-7.

Petermann F, Korn T. Cytokines and effector T cell subsets causing autoimmune CNS disease. FEBS Letters.2011; 585: p.3747–3757

Platten M, H.P., Youssef M, Fontoura P, Garren H, Hur EM, Guptar R, Lee Ly, Kidd BA, Robinson WH, Sobel WA, Selley, Steinman L. Treatment of Autoimmune Neuroinflammation with a Synthetic Tryptophan Metabolite. Science. 2005; 310: p.850-858.

Pin JP, Duvoisin R. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. Neuropharmacology. 1995; 34: p.1-26.

Polman CH, OCP, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH, Phillips JT, Lublin FD, Giovannoni G, Wajgt A, Toal M, Lynn F, Panzara MA, Sandrock AW. A randomized placebo controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. N Eng J Med. 2006; 354: p.899-910

Ponomarev E, Novikova M, Maresz K, Shriver LP, Dittel BN. Development of a culture system that supports adult microglial cell proliferation and maintenance in the resting state. Journal of Immunological Methods. 2005a; 300: p.32–46.

Ponomarev E, Shriver LP, Maresz K, Dittel BN, Microglial cell activation and proliferation preceds the onset of CNS autoimmunity. J Neurosc Res. 2005b; 81: p.374-389.

Ponomarev ED, Shriver LP, Maresz K, Pedras-Vasconcelos J, Verthelyi D, Dittel BN. GM-CSF Production by Autoreactive T Cells Is Required for the Activation of

Microglial Cells and the Onset of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. The Journal of Immunology. 2007; 178: p.39–48.

Ponomarev E, Veremeyko T, Barteneva N, Krichevsky AM, Weiner HL. MicroRNA-124 promotes microglia quiescence and suppresses EAE by deactivating macrophages via the C/EBP-α-PU.1 pathway. Nat Med. 2011; 17: p.64-70

Prinz M, Mildner A. Microglia in the CNS: immigrants from another world. Glia. 2011; 59: p.177–187.

Puccetti. The Combined Effects of Tryptophan Starvation and Tryptophan Catabolites

Down-Regulate T Cell Receptor zeta-Chain and Induce a Regulatory Phenotype in

Naive T Cells. J Immunol. 2006; 176: p.6752-6761.

Qian L. E Flood P. Microglial cells and Parkinson's disease. Immunol Res. 2008; 41: p.155–164.

Quintana FJ, Basso AS, Iglesias AH, Korn T, Farez MF, Bettelli E, Caccamo M, Oukka M, Weiner HL. Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. Nature. 2008; 453: p.65-71

Racke MK, HW, Lovertt- Racke AE. PTX Cruiser: driving autoimmunity via TLR4. Trends Immunol. 2005; 26: p.289-291.

Ransohoff RM, Perry VH. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. Annu Rev Immunol. 2009; 27: p.119-45.

Robinson JL, Geser F, Corrada MM, Berlau DJ, Arnold SE, Lee VM, Kawas CH, Trojanowski JQ. Neocortical and hippocampal amyloid-β and tau measures associate with dementia in the oldest-old. Brain. 2011; 134: p.3708-15.

Rojanathammanee L, Puig KL, Combs CK. Pomegranate Polyphenols and Extract Inhibit Nuclear Factor of Activated T-Cell Activity and Microglial Activation In Vitro and in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer Disease. J Nutr. 2013;

Romanatto T, Roman EA, Arruda AP, Denis RG, Solon C, Milanski M, Moraes JC, Bonfleur ML, Degasperi GR, Picardi PK, Hirabara S, Boschero AC, Curi R, Velloso LA. Deletion of Tumor Necrosis Factor-. Receptor 1 (TNFR1) Protects against Dietinduced Obesity by Means of Increased Thermogenesis. The Journal of Biological Chemistry. 2009; 284: p.36213–36222.

Rothwell NJ. Immune Responses in the Nervous System.Manchester: Bios Scientific Publishers;1995.

Rukiye-Nazan E. Dogan, A.E., and William J. Karpus. Production of CCL2 by Central Nervous System Cells Regulates Development of Murine Experimental Autoimmune Encephalomyelitis through the Recruitment of TNF- and iNOS-Expressing Macrophages and Myeloid Dendritic Cells. J Immunol. 2008; 180: p.7376 –7384.

Screibert T, SV, Cain D, Alon R, Sacskstein R. Shear flow-dependent integration of apical and subendothelial chemokines in T cell transmigration: implications for locomotion and the "multi-step paradigm". Blood. 2006; 109: p.1381–1386.

Shijie J, Takeuchi H, Yawata I, Harada Y, Sonobe Y, Doi Y, Liang J, Hua L, Yasuoka S, Zhou Y, Noda M, Kawanokuchi J, Mizuno T, Suzumura A. Blockade of glutamate Release from Microglia attenuates Experimenta Autoimmune Encephalomyelitis in mice. Tohoku J Exp Med. 2009; 217: p.87-92.

Stockinger B, Veldhoen M. Differentiation and function of Th17 T cells. Curr Opin Immunol. 2007; 19: p.281-86.

Stone TW, S.N., Darlington LG. An expanding range of targets for kynurenine metabolites of tryptophan. Trends Pharmacol Sci. 2013; 34: p.136-143.

Taylor DL, Diemel LT, Pocock JM. Activation of microglial group III metabotropic glutamate receptors protects neurons against microglial neurotoxicity. J. Neurosci.2003; 23: p.2150–60.

Toft-Hansen H, Uchtbauer L, Owens T. Inhibition of Reactive Astrocytosis in Established Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Favors Infiltration by Myeloid Cells Over T Cells and Enhances Severity of Disease. GLIA. 2011; 59: p.166–176.

Tremblay ME, Stevens B, Sierra A, Wake H, Bessis A, Nimmerjahn A. The Role of Microglia in the Healthy Brain. J Neurosci. 2011; 31: p.16064-16069.

Turrin NP, Rivest S. Molecular and cellular immune mediators of neuroprotection. Mol Neurobiol. 2006; 34: p.221–242.

Turrin NP, Rivest S. Unraveling the Molecular Details Involved in the Intimate Link between the Immune and Neuroendocrine Systems. Experimental Biology and Medicine. 2004; 229: p.996-1006.

Veldhoen, M, Hocking, R.J, Atkins, C.J, Locksley, R.M, and Stockinger, B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. Immunity. 2006; 24: p.179-189.

Volpe E, SN, Zollinger R, Bogiatzi SI, Hupé P, Barillot E, Soumelis V. A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. Nat Immunol. 2008; 9: p.650-7

Wake H, Moorhouse AJ, Jinno S, Kohsaka S, Nabekura J. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. J Neurosci. 2009; 29: p.3974–3980.

Weber MS, P.h.T., Youssef S, Dunn SE, Rundle CD, Lee L, Patarroyo JC, Stüve O, Sobel RA, Steinman L, Zamvil SS. Type II monocytes modulate T cell-mediated central nervous system autoimmune disease. Nat Med. 2007; 13: p.935-943.

Weiner, H.L. A shift from adaptive to innate immunity: a potential mechanism of disease progression in multiple sclerosis. J Neurol. 2008; 55: p.3-11.

Wong WT. Microglial aging in the healthy CNS: phenotypes, drivers, and rejuvenation. Front Cell Neurosci. 2013; 7: p.22

Yamanaka M, Ishikawa T, Griep A, Axt D, Kummer MP, Heneka MT. PPARγ/RXRα-induced and CD36-mediated microglial amyloid-β phagocytosis results in cognitive improvement in amyloid precursor protein/presenilin 1 mice. J Neurosci. 2012; 32: p.17321-31.

Zepp J, Wu L, Li X. IL-17 receptor signaling and Th17-mediated autoimmune demyelinating disease. Trends Immunol. 2011; 32: p.232–239.

Zhou L, Spolski R, Sherendoz K, Egawa T, Levy DE, Leonard WJ, Littmann DR. IL-6 programs Th17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. Nat Immunol. 2007; 8: p.1-8.