



Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Instituto Biomédico  
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

**Impacto da dopamina na resposta proliferativa e  
produção de citocinas pelas células T de pacientes com  
esclerose múltipla remitente-recorrente**

**Thaís Bezerra Ferreira**

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cleonice Alves de Melo Bento

Rio de Janeiro

2013

## Ficha Catalográfica:

Ferreira, Thaís Bezerra

Impacto da dopamina na resposta proliferativa e produção de citocinas pelas células T de pacientes com esclerose múltipla remitente-recorrente / Thaís Bezerra Ferreira – Rio de Janeiro, 2013

xviii 96f.: il.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

1. Esclerose Múltipla. 2. Autoimunidade. 3. Dopamina. 4. Imunidade Adquirida

I. Título

**Thaís Bezerra Ferreira**

**Impacto da dopamina na resposta proliferativa e  
produção de citocinas pelas células T de pacientes com  
esclerose múltipla remitente-recorrente**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cleonice Alves de Melo Bento

Rio de Janeiro

2013

**Thaís Bezerra Ferreira**

**Impacto da dopamina na resposta proliferativa e  
produção de citocinas pelas células T de pacientes com  
esclerose múltipla remitente-recorrente**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

**Banca examinadora:**

Dr. Arnaldo Feitosa Braga de Andrade (Doutor em Ciências) – UERJ

Dra. Cláudia Cristina Ferreira Vasconcelos (Doutora em Neurologia)

– UNIRIO

Dra. Landi Veivi Guillermo Costilla (Doutora em Ciências Biológicas)

– UNIRIO

*Eu pensava que nós seguíamos caminhos já feitos, mas parece que não os há. O  
nosso ir faz o caminho".*

C.S.Lewis

Aos meus pais... obrigada por tudo.

## **Agradecimentos:**

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, aquele que me trouxe à vida num ato de infinito amor. Agradeço pela companhia e pela força que Ele me deu para que eu alcançasse o final de mais uma etapa.

Gostaria de agradecer a meus pais, Robson e Isaita, aqueles através de quem Deus me mandou a esse mundo. Eu mesma não poderia escolher pais melhores.

A toda minha família, principalmente à minha irmã, Thainá, e a minha avó, Eunice. Obrigada por todo carinho.

À professora Cleonice, um dos presentes que a UNIRIO me deu. Obrigada por ser muito mais do que uma orientadora. Obrigada por ser mãe de cada uma de nós.

À professora Landi, que foi a revisora desta dissertação e tem acompanhado desde o início os nossos experimentos. Suas adições foram preciosas. Obrigada também por todo carinho e atenção para comigo.

À professora Vera Carolina, por todas as dúvidas tiradas, por toda paciência, por todo incentivo.

Às meninas do LILIT, Joana, Priscila, Taíssa e, especialmente, Bruna por todo apoio, por toda compreensão, por sempre ouvirem minhas prévias exaustivamente, a ponto de conhecer as apresentações de cor. Vocês são irmãos que a UNIRIO me deu.

À minha turma de Mestrado, Ivna, André, Marcela e Emily. Foi maravilhoso ter vocês como companheiros de jornada.

À Talita, minha companheira de aventuras. Sem você, minha vida não teria nem um décimo da diversão que tem.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação, agradeço pela disponibilidade e contribuição dada à minha formação acadêmica.

A todos que doaram tão gentilmente seu sangue e permitiram que essa dissertação fosse escrita. Espero que essas descobertas possam melhorar suas vidas.

À equipe de Dra. Regina Alvarenga, por ser a ponte entre a clínica e a pesquisa.

A todos os professores, que passaram pela minha vida e contribuíram para a minha formação profissional.

Agradeço também às agências fomentadoras FAPERJ, CNPq, a UNIRIO e a CAPES pela verba disponibilizada para a compra de reagentes e equipamentos e pela bolsa de estudos sem os quais não seria possível realizar essa dissertação.

É também de cada uma dessas pessoas citadas e muitas outras que não estão aqui a vitória por mais uma etapa vencida.

## Sumário:

<b>I- INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
1.1- CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	01
1.2- ESCLEROSE MÚLTIPLA: A DOENÇA.....	02
1.3- IMUNOHISTOPATOLOGIA DAS LESÕES NEURONAIS NA ESCLEROSE MÚLTIPLA.....	06
1.4- BASES IMUNOLÓGICAS DA ESCLEROSE MÚLTIPLA: MODELO EM CONSTRUÇÃO.....	07
1.4.1- OS LINFÓCITOS TH1 E TH17 E A ESCLEROSE MÚLTIPLA.....	07
1.4.2- ESCLEROSE MÚLTIPLA E DISTÚRBIOS NA REGULAÇÃO IMUNE.....	12
1.5- A ESCLEROSE MÚLTIPLA: FATORES DE RISCO.....	15
1.6 – DOPAMINA: ESTRUTURA E SUA FUNÇÃO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC)..	18
1.6.1- DOPAMINA: PAPEL IMUNOMODULADOR.....	20
<b>II- OBJETIVOS.....</b>	<b>24</b>
2.1- GERAL.....	24
2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
<b>III- METODOLOGIA.....</b>	<b>25</b>
3.1- PACIENTES.....	25
3.2- COLETA E PURIFICAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE.....	25
3.3- CULTURA DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE E ESTÍMULOS.....	26
3.4- ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	28
3.5- DETERMINAÇÃO DE CITOCINAS.....	28
3.6- ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
<b>IV- RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
4.1- IMPACTO DA DOPAMINA NA RESPOSTA PROLIFERATIVA DAS CÉLULAS T DE PACIENTES COM EM-RR.....	30
4.2- EFEITO DA DA NO PERFIL DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS PRODUZIDAS PELAS CÉLULAS T DE PACIENTES COM EM-RR.....	31
4.3- IMPACTO DA DOPAMINA EM MODULAR A PRODUÇÃO DE CITOCINAS ANTI-INFLAMATÓRIAS.....	36
4.4- EFEITO MODULADOR DO GLICOCORTICOIDE NA PRODUÇÃO DE IL-17 PELAS CÉLULAS T ATIVADAS DE PACIENTES COM EM-RR CULTIVADAS NA PRESENÇA DE DOPAMINA.....	38
4.5- PAPEL DIFERENCIAL DOS SUBTIPOS DE CÉLULAS T E DO RECEPTOR PARA IL-6 NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM CULTURAS DE CÉLULAS DE EM-RR EM RESPOSTA À DOPAMINA.....	39
<b>V- DISCUSSÃO.....</b>	<b>43</b>

<b><u>VI- CONCLUSÕES .....</u></b>	<b><u>52</u></b>
<b><u>VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</u></b>	<b><u>54</u></b>
<b><u>VIII- ANEXOS.....</u></b>	<b><u>72</u></b>

## Lista de Figuras

Figura 01: Efeito <i>in vitro</i> da dopamina (DA) sobre proliferação das células T células de pacientes com EM-RR.....	31
Figura 02: Análise do perfil <i>in vitro</i> de citocinas do tipo Th1 e Th2 em pacientes com EM-RR na presença ou na ausência de dopamina (DA).....	33
Figura 03: Impacto da dopamina (DA) na produção <i>in vitro</i> de citocinas relacionadas ao fenótipo Th17 de pacientes com EM-RR.....	35
Figura 04: Correlação entre os níveis de IL-17 e IL-6 e a pontuação do EDSS dos pacientes com EM-RR.....	36
Figura 05: Impacto da dopamina (DA) na produção <i>in vitro</i> de citocinas relacionadas ao fenótipo Treg de pacientes com EM-RR.....	37
Figura 06: Modulação da produção de IL-17 pelas células T de pacientes com EM-RR ativadas na presença de DA pelo glicocorticoide.....	38
Figura 07: Papel das células T CD4 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup> na produção de IL-6 e IL-17 em pacientes com EM-RR.....	40
Figura 08: Envolvimento da sinalização via IL-6R na produção de IL-17 e IL-10 pelas células T CD4 <sup>+</sup> de pacientes com EM-RR.....	41

**Lista de quadros:**

Quadro 1: Os sistemas funcionais avaliados no âmbito da escala EDSS.....03

Quadro 2: Escala Expandida do Estado de Incapacidade (EDSS).....04

## Lista de Abreviaturas

AMPc – adenosina monofosfato cíclico  
CD – grupo de diferenciação  
CMSP – células mononucleares do sangue periférico  
CTL – linfócito T citotóxico  
DA – dopamina  
DAR – receptor para dopamina  
DC – célula dendrítica  
dp – desvio-padrão  
EAE – encefalite autoimune experimental  
EBV – vírus Epstein-Barr  
EDSS – *Expanded Disability Status Scale*  
ELISA – ensaio imunossorvente ligado à enzima  
EM – esclerose múltipla  
EM-PP – esclerose múltipla progressiva primária  
EM-PS – esclerose múltipla progressiva secundária  
EM-RR – esclerose múltipla remitente-recorrente  
FoxP3 – fator de transcrição forkhead box P3  
GITR – Receptor do TNF induzido por glicocorticoide  
HLA – antígeno leucocitário humano  
IDO – indoleamina-2,3-dioxigenase  
IFN – interferon  
Ig – imunoglobulina  
IL – interleucina  
iTreg – célula T reguladora induzida  
MHC – complexo principal de histocompatibilidade  
NK – célula assassina natural  
nTreg – célula T reguladora natural  
PHA – fitohematoglutina  
RNA – ácido ribonucleico  
SF – sistema funcional  
SFB – soro fetal bovino

SNC – sistema nervoso central  
SP – esclerose múltipla surto progressiva  
TCR – receptor da célula T  
TGF – fator de crescimento transformado  
Th1 – célula T helper ou auxiliadora do tipo 1  
Th17 - célula T helper ou auxiliadora do tipo 17  
Th2 – célula T helper ou auxiliadora do tipo 2  
TMB – 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina  
TNF – fator de necrose tumoral  
Tr-1 - célula T reguladora do tipo 1  
VMAT – vesícula transportadora de monoaminas

## Resumo

A esclerose múltipla (EM) é uma doença autoimune grave que ataca o sistema nervoso central. Alguns estudos têm indicado o envolvimento dos linfócitos Th1 e Th17 na imunopatogênese da EM. Quando chegam ao sistema nervoso central, essas células são expostas a novas condições, como a presença de neurotransmissores, dentre eles a dopamina (DA). Nesse contexto, até a presente data, nenhum estudo foi conduzido para avaliar o papel da DA no status funcional das células T de pacientes com EM. Portanto, o objetivo primário desse estudo é avaliar o impacto da dopamina (DA) na resposta proliferativa e produção de citocinas pelas células T de pacientes com EM com a forma recorrente remitente (EM-RR), comparando os resultados com o padrão observado em indivíduos saudáveis (grupo controle). Nossos resultados demonstraram que a proliferação das células T induzida pelo ativador policlonal fitohemaglutinina (PHA) foi menor nas culturas de pacientes com EM-RR quando comparado ao grupo controle. Nessas culturas, enquanto a DA reduziu significativamente resposta linfoproliferativa nas culturas controles, essa catecolamina elevou a expansão policlonal das células T de pacientes com EM-RR. Com relação ao tipo de citocina produzida, nenhuma diferença significativa na secreção de citocinas relacionadas ao fenótipo Th1 (IL-2 e IFN- $\gamma$ ) foi detectada entre os grupos estudados. Nesse sistema, enquanto a DA reduziu os níveis de IL-2 e IFN- $\gamma$  nas culturas controles, esse neurotransmissor elevou a produção de IFN- $\gamma$  pelos linfócitos T de pacientes com EM-RR. Com relação à produção de citocinas definidoras do fenótipo Th2, nenhuma diferença significativa foi observada na produção de IL-4 e IL-5 em resposta ao PHA, com ou sem DA. Em contraste, níveis significativamente superiores de citocinas relacionadas ao fenótipo Th17 (IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-17) foram detectados nas culturas de células dos pacientes com EM-RR. Interessantemente, foi observada uma correlação positiva entre os níveis de IL-6 e IL-17 e o grau de incapacidade neurológica dos pacientes. A adição de DA aumentou a produção não apenas de IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-17, como também da IL-21 nessas culturas. Finalmente, apesar de nenhuma diferença na produção de citocinas relacionadas ao fenótipo T regulador, a IL-10 e TGF- $\beta$ , ter sido observada em ambos os grupos, a adição da DA reduziu a liberação dessas

citocinas particularmente nas culturas de células dos pacientes com EM-RR. Ademais, a hidrocortisona foi menos eficiente em reduzir a produção de IL-17 nas culturas dos pacientes com EM-RR, quando comparados aos controles. Em nosso sistema, a capacidade da DA em amplificar a produção de IL-6 e IL-17 e reduzir a liberação de IL-10 nas culturas de células de pacientes com EM-RR foi particularmente dependente dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e da sinalização do receptor para IL-6. Em conjunto, os nossos resultados, apesar de preliminares, revelam uma elevada tendência das células T dos pacientes com EM-RR em produzir maiores níveis de citocinas relacionadas ao fenótipo Th17 com maior resistência a inibição ao glicocorticoide, fenômenos esses que foram amplificados pela adição de dopamina.

## Abstract

Multiple sclerosis (MS) is a severe autoimmune disease that attacks the central nervous system. Some studies have indicated the involvement of Th1 and Th17 cells in the immunopathogenesis of MS. When they reach to the central nervous system, these cells are exposed to new conditions, such as the presence of neurotransmitters, including dopamine (DA). In this context, to date, no study has been conducted to evaluate the role of DA in the functional status of T cells from patients with MS. Therefore, the primary objective of this study is to evaluate the impact of dopamine (DA) in the proliferative response and cytokine production by T cells from relapsing-remitting MS patients (RR-MS), comparing the results with the pattern observed in healthy subjects (control group). Our results demonstrated that the proliferation of T cells induced polyclonal activator phytohemagglutinin (PHA) was lower in cultures of RR-MS patients as compared to controls. The DA addition to these cultures significantly reduced lymphoproliferative response in control group, but elevated the polyclonal expansion of T cells of patients with RR-MS. Regarding the type of cytokine produced, no significant difference in the secretion of Th1-related cytokines (IL-2 and IFN- $\gamma$ ) was detected between the two groups. In this system, while DA reduced the levels of IL-2 and IFN- $\gamma$  in control cultures, this neurotransmitter increased the IFN- $\gamma$  production by T lymphocytes of patients with RR-MS. Concerning Th2-related cytokines production, no significant difference was observed in the IL-4 and IL-5 levels in response to PHA, with or without DA, between the groups. In contrast, significantly higher levels of cytokines related to Th17 phenotype (IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-17) were detected in cell cultures from patients with RR-MS. Interestingly, we observed a positive correlation between IL-6 and IL-17 levels and the degree of neurological disability of patients. The addition of DA not only increased the production of IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-17, as well as IL-21 in MS-derived cell cultures. Finally, although no difference in production of cytokines related to T regulatory phenotype (IL-10 and TGF- $\beta$ ) had been observed in both groups, the addition of DA reduced the release of these cytokines particularly in cultures of cells of RR-MS patients. Additionally, hydrocortisone was less effective in reducing the production of IL-17 in cultures of RR-MS patients compared to controls. In our system, the ability of DA in amplifying the production of IL-6 and IL-17 and reducing the release of IL-10 in cell

cultures from RR-MS patients was particularly dependent on CD4<sup>+</sup> T cells and signaling through IL-6 receptor. Taken together, our results, although preliminary, indicate a high tendency of T cells of patients with RR-MS to produce increased levels of cytokines related to Th17 phenotype with increased resistance to inhibition by glucocorticoids, both phenomena were amplified by the addition of dopamine.

## I- INTRODUÇÃO

### 1.1- Considerações gerais

A esclerose múltipla (EM) é uma doença progressiva autoimune que afeta o sistema nervoso central (SNC) causando destruição da bainha de mielina, estrutura fundamental na transmissão do impulso nervoso (Adams & Victor, 1989). A doença leva a graus variados de incapacidade neurológica, com déficits nas funções sensitivas e visuais e nas funções motoras, autônomas e neurocognitivas (McFarlin & Mc Farland, 1982). A EM pode envolver qualquer parte do SNC, de modo que a lista de sinais e sintomas pode ser infinita (Haegert, Swift & Benedikz, 1996). Caracteristicamente a EM é descrita como disseminada no tempo e no espaço, o que implica comprometimento de diversas áreas do SNC e em épocas diferentes. É uma doença que afeta principalmente adultos jovens, entre 20 a 40 anos de idade, e leva à significativa disfunção neurológica.

A doença é mais comum em mulheres, e estima-se que no mundo mais de 2 milhões de pessoas tenham EM. Acredita-se que, nos EUA, ao menos 350.000 pessoas são afetadas e que um caso novo em cada mil pessoas seja diagnosticado (Anderson et al., 1992; Sospedra & Martin, 2005; Hirtz et al., 2007). No Brasil, sua taxa de prevalência é de aproximadamente 15 casos por cada 100.000 habitantes (Callegaro, Goldbaum & Morais, 1997; Fragoso & Peres, 2007).

Por ter uma etiologia multifatorial, eventos imunes e ambientais podem influenciar na evolução clínica da EM, tal como o estresse. Na EM, alguns estudos têm correlacionados eventos estressantes precipitando uma recaída clínica ou exacerbação (Beiske *et al.*, 2008; Feinstein, 2011). Como a resposta biológica ao estresse é caracterizada pela produção elevada de catecolaminas em níveis

periféricos e centrais, faltam estudos avaliando o impacto da dopamina, a principal catecolamina do SNC, no perfil funcional das células T de pacientes com EM.

## **1.2- Esclerose múltipla: a doença**

Na maioria dos pacientes a doença se manifesta pela primeira vez como uma síndrome clínica isolada sugestiva de EM, tipicamente com neurite óptica, síndrome tronco-encefálico ou mielite. A doença pode seguir três principais cursos: remitente-recorrente (EM-RR), progressiva primária (EM-PP) e progressiva secundária (EM-PS) (Shibasaki, McDonald & Kuroiwa, 1981). A forma EM-RR é diagnosticada na maioria dos casos de EM (> 80%) e caracteriza-se por apresentar episódios agudos de comprometimento neurológico, com duração mínima de 24 horas e com no mínimo trinta dias entre cada surto (Schumacher *et al.*, 1965). A forma EM-PS representa, na verdade, uma progressão da forma EM-RR. Não se sabe o que dispara essa progressão de uma forma mais inflamatória e responsiva à terapia para uma forma secundária progressiva, neurodegenerativa e refratária ao tratamento. A forma EM-PP é caracterizada por um curso progressivo já seguindo a primeira manifestação da doença e é totalmente refratária ao tratamento correntemente disponível.

Os sintomas iniciais mais comuns compreendem alterações piramidais, sensitivas e cerebelares e manifestações visuais e esfinterianas (revisito por Poser & Poser, 1983). Os sinais piramidais englobam fraqueza, espasticidade, sinais de liberação piramidal. As alterações cerebelares podem ser divididas em comprometimento do equilíbrio e da coordenação. Os principais distúrbios visuais são diminuição da acuidade visual, diplopia e escotomas, quase sempre reconhecidos como embaçamento visual. O comprometimento esfinteriano

apresenta-se sob a forma de incontinência ou retenção urinária e fecal. A fadiga, que pode significar menor tolerância às atividades diárias, é uma queixa muito comum e pode ser o sintoma mais limitante. Sabe-se que fadiga é relatada em até 90% dos pacientes e tem sido relacionada ao nível de ansiedade e depressão dos pacientes (Bakshi *et al.*, 2000). Alterações cognitivas podem acometer de 54% a 65% dos pacientes com EM (Rao *et al.*, 1991). A aplicação sistemática de testes neuropsicológicos revela especialmente alteração de memória.

Seguindo a avaliação da extensão dos distúrbios nos sistemas funcionais (SFs, Quadro 1), os pacientes com EM são estadiados utilizando a escala chamada *Expanded Disability Status Scale* (EDSS) (Tabela 1), que mede o grau de incapacidade neurológica do paciente (Kurtzke, 1983). O EDSS possui vinte itens com valores variando de 0 a 10, com pontuação aumentando em meio ponto conforme o grau de incapacidade do paciente, dando maior enfoque à capacidade de deambulação do paciente (principalmente quando o EDSS é maior que 4,0). Esta classificação vai desde o normal, que é zero, até à incapacidade máxima, que pode ser cinco ou seis.

#### **Quadro 1. Os sistemas funcionais avaliados no âmbito da escala EDSS**

- 
- ✓ Funções Piramidais - movimento voluntário
  - ✓ Funções do Tronco Cerebral - movimento dos olhos, sensação e movimento da face, deglutir.
  - ✓ Funções Visuais (ou Ópticas)
  - ✓ Funções Cerebrais (ou Mentais)- memória, concentração, humor
  - ✓ Funções Cerebelares - coordenação do movimento ou equilíbrio
-

- 
- ✓ Funções Sensitivas
  - ✓ Funções Intestinais e Vesicais
  - ✓ Outras Funções - incluindo a fadiga
- 

## **Quadro 2. Escala Expandida do Estado de Incapacidade (EDSS)<sup>1</sup>**

---

- 0.0** - Exame neurológico normal (FS grau 0).
  - 1.0** - Nenhuma deficiência, sinais mínimos em 1 FS (1 FS 1).
  - 1.5** - Nenhuma deficiência, sinais mínimos em 1 FS, excluindo função cerebral grau 1 (mais de 1 FS 1).
  - 2.0** - Deficiência mínima em 1 FS (1 FS 2, outros 0 ou 1).
  - 2.5** - Deficiência mínima em 2 FS (2 FS 2, outros 0 ou 1).
  - 3.0** - Deficiência moderada em 1 FS (1 FS 3, outros 0 ou 1) ou deficiência leve em 3 ou 4 FS (3 ou 4 FS 2, outros 0 ou 1), embora com marcha livre.
  - 3.5** - Marcha livre mas com deficiência moderada em 1 FS (1 FS 3) e 1 ou 2 FS 2, ou 2 FS 3, ou 5 FS 2 (outros 0 ou 1).
  - 4.0** - Marcha livre sem órtese, independente, por 12 h/dia apesar de deficiência relativamente severa de 1 FS 4 (outros 0 ou 1) ou combinações de graus menores excedendo os limites dos passos anteriores, capaz de andar sem auxílio e sem descanso por 500 metros.
  - 4.5** - Marcha livre sem auxílio durante grande parte do dia, capaz de trabalhar o dia todo, pode, contudo, ter alguma limitação para atividade livre ou requerer mínima assistência; caracterizado por deficiência relativamente severa consistindo de 1 FS 4 (outros 0 ou 1) ou combinações de graus menores e marcha livre por 300 metros.
-

- 
- 5.0** - Marcha livre por 200 metros; deficiência severa atrapalhando as atividades diárias; geralmente 1 FS 5 (outros 0 ou 1) ou combinações de graus menores.
- 5.5** - Marcha livre por 100 metros; deficiência severa para impedir as Atividades de Vida Diária (AVD), (1 FS 5, outros 0 ou 1).
- 6.0** - Auxílio intermitente ou unilateral (bengala, muleta, aparelho tutor, órtese) necessário para andar 100 metros com ou sem descansar (+ de 2 FS 3).
- 6.5** - Auxílio bilateral constante para andar 20 metros (+ de 2 FS 3).
- 7.0** - Incapaz de andar 5 metros mesmo com auxílio, necessita de cadeira-de-rodas (CR) comum e faz transferência sozinho, toca a CR por 12 h/dia (= de 1 FS 4; muito raramente só 1 FS 5).
- 7.5** - Incapaz de andar mais que poucos passos, restrito à CR, pode precisar de auxílio para transferência, toca a CR, mas não pode se manter na CR comum o dia todo. Pode necessitar de CR motorizada (+ de 1 FS 4+).
- 8.0** - Essencialmente restrito ao leito ou CR, pode ficar na CR boa parte do dia, mantém muitos cuidados pessoais, geralmente tem o uso efetivo dos membros superiores (FS 4 em muitos sistemas).
- 8.5** - Restrito ao leito boa parte do dia, tem alguma função de membros superiores; mantém alguns cuidados pessoais (FS 4 em vários sistemas).
- 9.0** - Dependente no leito; pode se comunicar e se alimentar (FS 4 na maioria).
- 9.5** - Totalmente dependente no leito, incapaz de deglutir ou se alimentar (todos os FS 4 ou 5).
- 10,0** - Morte por Esclerose Múltipla

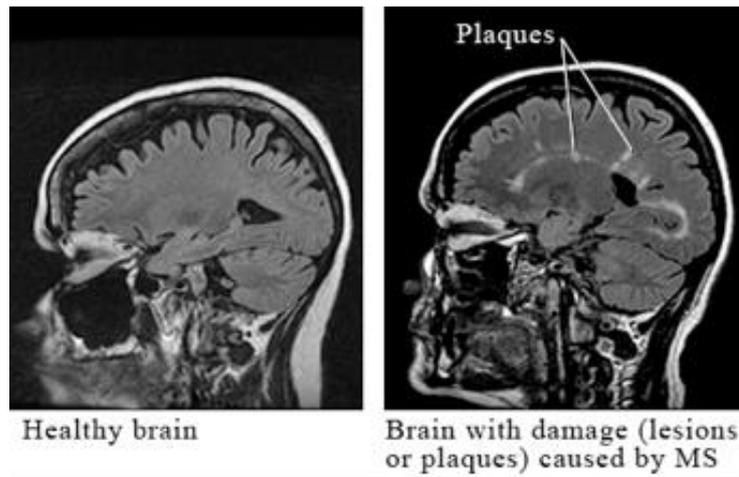
---

<sup>1</sup> Expanded Disability Status Scale

### **1.3- Imunohistopatologia das lesões neuronais na esclerose múltipla**

A EM é caracterizada por desmielinização, inflamação multifocal, perda axonal e de oligodendrócitos (Adams & Victor, 1989). Macroscopicamente, as lesões são identificadas na ressonância como placas de coloração cinza de tamanhos variados (Adams & Victor, 1989) (Figura 1). As placas antigas apresentam-se bem demarcadas, enquanto as mais novas, por causa do edema, possuem limites imprecisos. Em casos de longa duração, nota-se atrofia cerebral com alargamento dos ventrículos laterais.

Achados a partir das amostras de tecido cerebral e medular de necropsia de pacientes revelaram um acúmulo perivascular de células T oligoclonais consistindo de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, monócitos e células B ocasionais com infrequentes plasmócitos e anticorpos específicos contra a mielina (Esiri, 1977; Mattson, Roos & Arnason, 1980; Genain *et al.*, 1999; revisto por Steinman, 2001). Entretanto, linfócitos T podem ser encontrados na substância branca aparentemente normal adjacente às lesões agudas. Por outro lado, os macrófagos são mais proeminentes no centro das placas contendo debris de mielina onde a contagem de oligodendrócitos é reduzida (Lucchinetti *et al.*, 2000). Nas lesões ativas crônicas, o infiltrado inflamatório celular é menos proeminente e é largamente restrito à borda da placa, sugerindo a presença de uma atividade inflamatória basal (Lucchinetti *et al.*, 2000). Finalmente, placas com evidência escassa de inflamação são também descritas como lesões crônicas inativas (Lucchinetti *et al.*, 2000).



**Figura 1. Placas características de lesões por EM mostradas em ressonância** (fonte: <https://myhealth.alberta.ca/health/pages/conditions.aspx?hwid=zm6056>)

#### **1.4- Bases imunológicas da esclerose múltipla: modelo em construção**

##### **1.4.1- Os linfócitos Th1 e Th17 e a esclerose múltipla**

Doenças autoimunes são resultado de uma reação dos linfócitos, a antígenos expressos em tecidos próprios. Essas células, uma vez ativadas, são capazes de responder como responderiam a um micro-organismo. Os motivos pelos quais isso ocorre não estão claros, mas já são conhecidos alguns fatores que podem aumentar ou diminuir o risco de desenvolver uma reação autoagressiva, e conseqüentemente, uma doença autoimune.

A EM, como as outras doenças autoimunes, ocorre em indivíduos geneticamente suscetíveis expostos a eventos ambientais que ativam as células T mielina-específicas capazes de atacar o SNC. Entretanto, muito de nosso conhecimento acerca das bases moleculares e celulares da imunopatologia da EM tem sido obtido através de estudos em modelo experimental da doença em camundongos, a chamada encefalomielite autoimune experimental (EAE – *experimental autoimmune encephalomyelitis*).

Na cinética da resposta imune celular da EAE, células dendríticas (DCs – *dendritic cells*), consideradas as melhores células apresentadoras de antígeno (APC – *antigen presenting cells*) do sistema imune (Almolda, Gonzalez & Castellano, 2011), ativam os linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> autorreativos contra antígenos da bainha de mielina no contexto de uma reação inflamatória nos gânglios paracervicais (Ando *et al.*, 1989). Essas células, quando ativadas, passam a expressar moléculas de adesão e receptores de quimiocinas que permitem a estas invadirem o parênquima encefálico (Kebir *et al.*, 2009). Com relação ao fenótipo, por muitos anos acreditava-se que as células T CD4<sup>+</sup> auxiliaadoras do tipo 1 (Th1 – *T helper 1*) ativadas pelas DCs seriam as únicas implicadas na imunopatologia da EAE e da EM (Yura *et al.*, 2001).

Células Th1 representam um subtipo funcional de células T CD4<sup>+</sup> induzido pelas DCs através da secreção de interleucina (IL)-12 (Zhu, Yamane & Paul, 2010). Os linfócitos Th1, quando ativados, secretam grandes quantidades de IL-2 e interferon (IFN)- $\gamma$ , e mediam uma resposta conhecida como imunidade celular, por envolver, majoritariamente, a ativação de fagócitos. O IFN- $\gamma$ , porém, não apenas aumenta o poder microbicida dos fagócitos humanos (macrófagos e neutrófilos), como também amplifica a função lítica das células assassinas naturais (NK – *natural killer*) e a produção de anticorpos das classes IgG1 e IgG3 pelos linfócitos B humanos (McKinstry *et al.*, 2010). Os eventos envolvidos na resposta imune celular são fundamentais para controlar todas as bactérias e protozoários que causam infecções intracelulares. Ademais, por auxiliar as células T CD8<sup>+</sup>, os linfócitos Th1 são imperativos numa boa resposta contra vírus e tumores (Obar & Lefrançois, 2010). Nesse sentido, as células T CD8<sup>+</sup> clássicas quando ativadas pelas DCs se transformam em linfócitos citotóxicos (CTL – *cytotoxic T lymphocytes*) (Coquerelle &

Moser, 2010). Esses CTLs eliminam células infectadas por vírus ou transformadas através da liberação de um poderoso arsenal de proteínas líticas, conhecidas como perforinas e granzimas, que induzem a morte do alvo por apoptose (Coquerelle & Moser, 2010).

A descrença sobre o envolvimento das células Th1 como protagonista na gênese da EM veio a partir dos estudos de EAE conduzidos em camundongos deficientes nos genes que codificam citocinas relacionadas a esse fenótipo de célula T CD4<sup>+</sup> (revisto por Lovett-Racke, Yang & Racke, 2011). Nesse sentido, trabalhos demonstraram que animais deficientes em IL-12 e IFN- $\gamma$  desenvolveram quadro severo de incapacidade neurológica seguindo a indução de EAE (Lublin *et al.*, 1993; Ferber *et al.*, 1996; Willenborg *et al.*, 1996; Chu, Wittmer & Dalton, 2000; Becher, Durell & Noelle, 2002). Em contraste, camundongos deficientes em IL-23 ou em IL-6 eram completamente resistentes a EAE (Okuda *et al.*, 1998; Cua *et al.*, 2003; Langrish *et al.*, 2005). Finalmente, animais com deficiências na diferenciação em Th17 não desenvolveram a EAE (Liu *et al.*, 2008).

A IL-23 é uma citocina crucial para o desenvolvimento de células Th17, uma distinta linhagem de células T CD4<sup>+</sup> que é caracterizada pela produção de IL-17 (também conhecida como IL-17A), IL-17F, IL-22 e IL-21 (Gutcher & Becher, 2007). A habilidade das células Th17 em produzir essas citocinas inflamatórias e sua capacidade em induzir outras células a sintetizar IL-6, metaloproteinases de matriz e CXCL8 (também chamada de IL-8), potente quimioatraente de neutrófilos, sugere que esses linfócitos T *helper* possam contribuir para dano neuronal característico da EM (Miossec, 2009).

Indícios sobre a participação das células Th17 em pacientes com EM também tem sido descritos em estudos clínicos (Brucklacher-Waldert *et al.*, 2009). Elevados

níveis de transcritos de RNA mensageiro para IL-17 foram detectados nas lesões crônicas de pacientes com EM, quando comparado com as lesões agudas (Matusevicius *et al.*, 1999; Lock *et al.*, 2002; revisto por Lovett-Racke, Yang & Racke, 2011). Níveis séricos e liquoricos elevados de metaloproteinase do tipo 9 nos pacientes com EM foram diretamente relacionados ao rompimento da barreira hematoencefálica e a atividade clínica e radiológica da doença (revisto por Lovett-Racke, Yang & Racke, 2011). Ademais, a migração das células Th17 para o SNC é facilitado pela produção elevada da quimiocina CCL20 pelas células epiteliais do plexo coroide (revisto por Wolburg & Paulus, 2010). A CCL20 atrai células T CCR6<sup>+</sup>, exatamente os linfócitos Th17 (Reboldi *et al.*, 2009). Evidências a partir de estudos de imagem confirmam que o espaço subaracnóide é o primeiro sítio no qual as células T CD4<sup>+</sup>, previamente ativadas na periferia, são reativadas (revisto por Wolburg & Paulus, 2010). Quando dentro do parênquima cerebral e medular, a produção *in situ* de níveis elevados de citocinas inflamatórias por esses linfócitos induz a expressão de diferentes moléculas de adesão e produção de quimiocinas pelas células endoteliais perivasculares, amplificando assim o recrutamento de outras células T para o espaço perivascular (revisto por Lovett-Racke, Yang & Racke, 2011). Periféricamente, expressão elevada de IL-17 e IL-6 tem sido detectada nas células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de pacientes durante as recaídas clínicas (Matusevicius *et al.*, 1999), assim como a frequência de células Th17 aumenta significativamente no líquido de pacientes com EM-RR durante os surtos clínicos (Brucklacher-Waldert *et al.*, 2009).

Apesar dos dados atuais apontarem um maior envolvimento dos linfócitos Th17 na fisiopatogenia da EM, para a maioria dos pesquisadores, as citocinas produzidas por Th1 continuam sendo importantes no dano neuronal. Níveis elevados de IL-12,

citocina envolvida na indução do fenótipo Th1, têm sido detectados nos sangue periférico de pacientes com EM em surto clínico e têm sido correlacionados ao déficit neurológico, medido pelo EDSS (Skurkovich *et al.*, 2001; Brucklacher-Waldert *et al.*, 2009). O IFN- $\gamma$ , citocina clássica do fenótipo Th1, induz apoptose de oligodendrócitos humanos e, nas lesões da EM, a expressão de IFN- $\gamma$  co-localiza-se com oligodendrócitos em apoptose (Kebir *et al.*, 2009). Ademais, no modelo EAE, apesar de a transferência de células Th17 induzir uma doença mais severa, camundongos que receberam células Th1 mielina-específicas também apresentaram certo grau de déficit neurológico (Becher *et al.*, 2002; Gran *et al.*, 2002). Para alguns autores, no início dos surtos clínicos, citocinas relacionadas tanto ao fenótipo Th1 quanto Th17 estão envolvidas nas lesões medulares (revisto por Lovett-Racke, Yang & Racke, 2011). Entretanto, à medida que a doença progride, células produtoras de IL-17 passam a ser dominantes no infiltrado inflamatório (revisto por Lovett-Racke, Yang & Racke, 2011). Esses resultados sugerem, portanto, que ambos os fenótipos de células T CD4<sup>+</sup> contribuem, com cinética diferente, no curso da doença.

Finalmente, além das células T CD4<sup>+</sup>, os linfócitos T CD8<sup>+</sup> devem executar um papel importante na imunopatologia da EM. Estudos têm demonstrado que o desenvolvimento de novas lesões no SNC tem sido correlacionado, principalmente, com o nível de infiltração medular de células T CD8<sup>+</sup> periféricas, melhor que de células T CD4<sup>+</sup> (Bjartmar, Wujek & Trapp, 2003). Os mecanismos lesivos mediados pelos linfócitos TCD8<sup>+</sup> no processo de desmielinização envolvem a direta liberação de proteínas tóxicas, as perforinas e granzimas, e a secreção de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , e IL-17 que induzem a produção de radicais livres derivados do oxigênio conduzindo a morte dos oligodendrócitos (Bjartmar, Wujek & Trapp, 2003).

#### 1.4.2- Esclerose múltipla e distúrbios na regulação imune

Apesar de células T específicas para antígenos da mielina também serem detectadas em indivíduos saudáveis, estas apresentam um fenótipo ativado apenas no sangue periférico e no líquido de pacientes com EM. Isso sugere que mecanismos de regulação estão deficientes em pacientes com EM.

A regulação das respostas mediadas pelos linfócitos T efetores Th1 e Th17 é importante para evitar o desenvolvimento de doenças imunomediadas pela produção excessiva de citocinas inflamatórias (Costantino *et al.*, 2008). Sabemos, por exemplo, que respostas exacerbadas mediadas pelos linfócitos Th1 e, principalmente, Th17 estão envolvidas não apenas na gênese da EM, como também de outras doenças autoimunes (Zaghouani *et al.*, 2009). Portanto, a regulação das respostas imunes mediadas pelos linfócitos T efetores é fundamental para a manutenção da homeostase, e é principalmente exercida por um conjunto de células T reguladoras. (Vignali *et al.*, 2008)

Com base na expressão de determinados marcadores, as células T reguladoras consistem em uma população relativamente heterogênea que possui em comum algumas propriedades, tais como hiporresponsividade à estimulação antigênica e função imunossupressora (Saito *et al.*, 2007). Dentre elas, destacam-se as células T reguladoras do tipo 1 (Tr-1 – *regulator T cell type 1*) e, mais recentemente, as células T CD4<sup>+</sup> reguladoras naturais (nTregs), ambas sendo majoritariamente CD4<sup>+</sup> (Aluvihare *et al.*, 2004; Saito *et al.*, 2007).

As células nTregs são primariamente originárias do timo e fenotipicamente expressam grandes quantidades da cadeia  $\alpha$  do receptor para a IL-2 (CD25) na superfície e, intracelularmente, o fator transcricional chamado FoxP3 (FoxP3 –

*forkhead winged helix*) (Shevach *et al.*, 2006). Adicionalmente, em humanos, essas células são positivas para os marcadores de membrana CD45RO, CD62L, GITR (GITR – *glucocorticoid-induced TNF receptor*) (Shevach *et al.*, 2006) associada à ausência do receptor para IL-7 (CD127) (Liu *et al.*, 2006). Células Tregs ativadas produzem as citocinas anti-inflamatórias fator de crescimento transformado- $\beta$  (TGF- $\beta$  – *transformed growth factor- $\beta$* ), IL-10 e IL-35 (Dieckmann *et al.*, 2001) e suprimem proliferação e função das células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> não só de forma parácrina, através do efeito inibitório dessas citocinas, mas principalmente através de contato, como por exemplo a inibição da apresentação de antígeno pelas DCs imunogênicas através da expressão do CTLA-4 nas Tregs (Piccirillo & Shevach, 2001; Grohmann *et al.*, 2002; Wing *et al.*, 2002; Fallarino *et al.*, 2003; Nakamura *et al.*, 2004; Shevach, 2009; Lee *et al.*, 2009).

Apesar de uma origem central, mais recentemente, vários artigos têm demonstrado que células nTregs-símiles podem ser obtidas a partir de linfócitos TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> virgens quando ativadas na presença de TGF- $\beta$  (Fantini *et al.*, 2004; Polanczyk *et al.*, 2004; Walker *et al.*, 2005; Polanczyk *et al.*, 2006; Tai *et al.*, 2008). Essas Treg induzidas (iTreg – *induced T regulatory cells*) apresentam o mesmo fenótipo das nTregs e, quando ativadas, secretam grandes quantidades de TGF- $\beta$  e IL-10 (Polanczyk *et al.*, 2004; Polanczyk *et al.*, 2006; Tai *et al.*, 2008). Atualmente, alguns autores sugerem que as iTreg podem, na verdade, representar as clássicas células Th3 (Xu *et al.*, 2010).

O fenótipo Tr1, muitas vezes referida como célula reguladora FoxP3-negativa, conhecida em produzir níveis elevados de IL-10, é induzida na presença de IL-10 e IL-27 (Barrat *et al.*, 2002; Aluvihare *et al.*, 2004; Carpentier *et al.*, 2009). A IL-10 é uma citocina com potente ação inibidora dos mecanismos efetores da resposta

imune mediada pelos fenótipos Th1 e Th17 (Groux *et al.*, 1997; Strobl & Knapp, 1999). Até o momento, não existe um marcador de superfície que identifique a célula Tr1.

No contexto da EM, enquanto alguns pesquisadores não tem identificado uma diferença significativa na frequência de células T reguladoras no sangue periférico de indivíduos saudáveis e de pacientes (Venken *et al.*, 2007; Michel *et al.*, 2008), vários estudos têm revelado, no entanto, incapacidade dessas células em inibir a proliferação e a produção de citocinas inflamatórias pelas células T efetoras específicas para proteínas da mielina (Venken *et al.*, 2007; Michel *et al.*, 2008; Venken *et al.*, 2008; Falcon, 2009; Ma *et al.*, 2009; Smolders *et al.*, 2009). Essa deficiência funcional pode estar relacionada à menor expressão intracelular da proteína FoxP3 descrita nas células T reguladoras de pacientes com EM (Venken *et al.*, 2007). Ademais, durante as recaídas clínicas, linfócitos T FoxP3<sup>+</sup> representam o infiltrado minoritário dentre os leucócitos no cérebro de pacientes com EM (Venken *et al.*, 2007). A menor frequência dessas células no SNC durante o surto pode indicar falha delas em migrar para as áreas de lesão devido a não expressão de adressinas específicas, reduzida sobrevivência local ou mesmo transformação dessas em células potencialmente encefalitogênicas de fenótipo Th17 (Venken *et al.*, 2007). Interessantemente, estudo por Michel e colaboradores (2008) sugere que falhas funcionais das células T reguladoras em controlar a reação inflamatória em pacientes com EM seja indireta, isto é, esteja relacionada à elevada produção de citocinas inflamatórias, tais como IFN- $\gamma$  e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$  – *tumor necrosis factor- $\alpha$* ), produzidos por linfócitos T efetores que expressam elevados níveis de receptor para a citocina IL-7, o CD127. Nesse estudo, a depleção *in vitro* dessas células CD4<sup>+</sup>CD127<sup>hi</sup> permitiu que os linfócitos T

reguladores dos pacientes com EM fossem igualmente capazes, quando comparado a indivíduos saudáveis, de inibir resposta inflamatória mediada por células T efetoras. Esses resultados sugerem que, na verdade, deficiências nos mecanismos de regulação possam estar atrelados à elevada produção de citocinas inflamatórias durante as crises clínicas dos pacientes com EM, e não há defeitos intrínsecos nos programas genéticos de indução e manutenção dessas células T reguladoras.

### **1.5- A Esclerose múltipla: fatores de risco.**

A EM é uma doença de etiologia multifatorial com influências de fatores genéticos e ambientais. Por se tratar de uma doença de mediação imune, alguns estudos têm descrito uma forte relação entre a expressão de alguns genes envolvidos na resposta imune com maior resistência ou suscetibilidade à EM. A expressão, por exemplo, de alguns alelos do complexo principal de histocompatibilidade (MHC – *major histocompatibility complex*) de classe II, particularmente os antígenos leucocitários humanos (HLA – *human leukocyte antigen*) HLA-DRβ5\*0101, HLA-DRβ1\*1501, HLA-DQA1\*0102, HLA-DQB1\*0602 e HLA-DRβ1\*0602 têm sido associados com maior suscetibilidade à EM (Runmarker *et al.*, 1994; Sospedra & Martin, 2005). Essas observações estão de acordo com a hipótese de que a EM seja uma doença autoimune mediada pelas células T CD4<sup>+</sup>, já que este é um subtipo de linfócito dependente das moléculas do complexo de HLA de classe II para reconhecer antígenos próprios da bainha de mielina. Outros genes também parecem afetar o risco de desenvolver a doença, tais como o nível de expressão das moléculas STAT-3 (STAT-3 – *signal transducer and activator of transcription 3*) (Spach *et al.*, 2009) e CD25 (Alcina *et al.*, 2009). O gene CD25

codifica a cadeia  $\alpha$  do receptor para a citocina IL-2, uma citocina fundamental para o bom funcionamento das células T reguladoras implicadas em proteger o indivíduo de doenças autoimunes (Hall et al., 2011). Deficiência na expressão desse receptor, portanto, eleva o risco de desenvolver a EM (Alcina et al., 2009). A molécula STAT-3 funciona como um transativador de promotores para diferentes genes envolvidos na ativação imune, incluindo a via de sinalização intracelular Jak-STAT que tem sido implicada na diferenciação das células T CD4<sup>+</sup> no fenótipo Th17. Como descrito previamente, as células Th17 específicas para peptídeos das proteínas da bainha mielina têm sido relacionadas à gênese da EM.

Outro fator de risco para EM é a hipovitaminose D. Um efeito protetor da vitamina D na EM é suspeitado pela redução no risco de EM associado à exposição solar. Estudos sugerem que altos níveis circulantes de vitamina D estão associados a baixo risco para esclerose múltipla (Munger, Levin & Hollis, 2006; Simpson, Taylor & Blizzard, 2010). Também a ocorrência da doença e sua progressão para alguns autores parecem estar associadas a baixos níveis de vitamina D (Jagannath, Fedorowicz & Asokan, 2011). Altos níveis séricos de vitamina D foram relacionados a menor risco de surtos em pacientes com EM-RR (Simpson, Taylor & Blizzard, 2010). Acredita-se que os benefícios da suplementação com vitamina D na EM estejam associados à capacidade dessa vitamina em reduzir a secreção de IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$  (Haase & Faustmann, 2004) e aumento na secreção de IL-10 (Correale, Ysraelit & Gaitán, 2009), reduzindo a inflamação associada à doença (Barnes et al., 2007).

Doenças infecciosas causadas por bactérias e, principalmente, por vírus têm sido há muito tempo associadas à EM (revisito por Ascherio & Munger, 2007). Dentre estes, a maioria dos estudos tem revelado uma relação mais frequente

entre infecção com o vírus do Epstein-Barr (EBV – *Epstein-Barr virus*) e EM (revisto por Ascherio & Mette, 2000).

No contexto da infecção pelo EBV, quando comparado a indivíduos controles que tiveram infecção assintomática na infância, pacientes jovens adultos que desenvolvem a manifestação aguda da doença, a mononucleose infecciosa, têm maior risco em desenvolver EM (revisto por Ascherio & Mette, 2000). Estudos objetivando identificar a relação entre esses dois eventos têm sugerido duas interessantes hipóteses: reação cruzada e quebra de tolerância imune. No primeiro caso, pesquisadores têm demonstrado a presença de reatividade cruzada entre células T dirigidas contra peptídeos do EBV capazes de reconhecer também epítomos da bainha de mielina (Cepok *et al.*, 2005). Entretanto, maior risco em desenvolver EM foi igualmente observado entre indivíduos seguindo doenças infecciosas agudas por outros patógenos (revisto por Ascherio & Munger, 2007). Portanto, esses dados nos levam a acreditar que, na verdade, infecções agudas possam agir como um sinal, um “gatilho” para a indução da resposta autoimune, tanto por favorecer a ativação das células Th1/Th17 contra antígenos da bainha de mielina quanto por induzir distúrbios funcionais no compartimento das células T reguladoras.

Finalmente, outro fator de risco que deve contribuir de maneira adversa no curso da EM é o estresse. Estresse psicológico tem sido implicado no desenvolvimento e exacerbações de doenças autoimunes (revisto por Stojanovich & Marisavljevich, 2008). Estudos apontam que casos de estresse psicológico precedem o surgimento e os surtos de EM em 70-80% dos pacientes (Warren, Greenhill & Warren, 1982)

Alguns estudos têm sugerido um papel dos mediadores do estresse em desregular o sistema imune e, conseqüentemente, favorecer o desenvolvimento de doenças autoimunes (revisto por Stojanovich & Marisavljevich, 2008). No contexto da EM, o estresse pode exercer um efeito deletério direto por aumentar a permeabilidade da barreira hemato-encefálica, favorecendo a migração de células imunes para o SNC (Esposito *et al.*, 2002).

Nesse sentido, como já foi mencionado, durante a evolução da EM, diversas populações celulares invadem o SNC. Essas células migrantes são, então, submetidas a condições novas, tal como a influência de neurotransmissores locais, como por exemplo, a dopamina (DA) que tem importantes funções imunoduladoras (McKenna *et al.*, 2002; Ferrari *et al.*, 2004; Kirillova *et al.*, 2008; Nakano *et al.*, 2008, 2009a).

### **1.6 – Dopamina: estrutura e sua função no sistema nervoso central (SNC)**

A dopamina (DA) é um neurotransmissor do grupo das catecolaminas (Missale *et al.*, 1998), que age em suas células-alvo através de duas classes de receptores, designados de tipo I (DAR I – *dopamine receptor type I*) e os de tipo II (DAR II – *dopamine receptor type II*) (Strange, 1993). Os DARs são receptores de membrana com sete domínios transmembrana, pertencentes à superfamília dos receptores acoplados a proteína G (Nakano *et al.*, 2009a). Os DAR I quando estimulados, se acoplam a proteína G<sub>s</sub> e levam a um aumento dos níveis intracelulares de adenosina-3'-5'-monofosfato cíclico (AMPc – *cyclic adenosine-3'5'-monophosphate*), enquanto os DAR II, se acoplam a proteína G<sub>ai</sub> e levam a uma diminuição dos níveis de AMPc intracelulares (Missale *et al.*, 1998, Salah *et al.*, 1989) Dentro dessas classes de receptores, encontram-se cinco tipos de

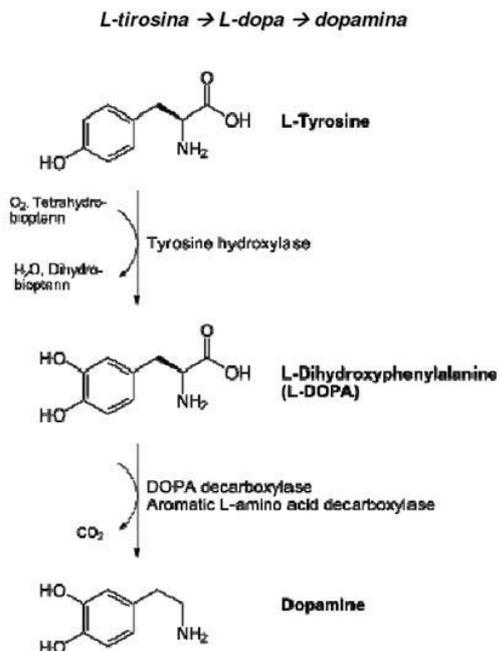
receptores: D1, D2, D3, D4 e D5. Enquanto D1 e D5 pertencem ao DAR I, os DAR II incluem D2, D3 e D4. Esses dois tipos de receptores permitem que a DA aja de diferentes formas numa mesma célula (Sidhu *et al.*, 1998, Salah *et al.*, 1989).

Esse neurotransmissor exerce muitas funções no SNC, tal como controle da motricidade (Cenci, 2007), percepções álgicas (Potvin, Grignon & Marchand, 2009), dependência química (Dayan, 2009), secreção hormonal (Ben-Jonathan & Hnasko, 2001), motivação e prazer (Wise, 2008) e funcionamento cardiovascular (Nakano *et al.*, 2009a). Na periferia, a DA é precursora de noradrenalina e da adrenalina, o maior neurotransmissor do sistema nervoso simpático e o principal hormônio adrenomedular, respectivamente.

A DA é derivada do aminoácido tirosina. A tirosina é convertida em L-DOPA pela enzima tirosina hidroxilase, etapa que determina a velocidade da reação. A L-DOPA, em seguida é metabolizada pela enzima aminoácido aromático descarboxilase gerando dopamina (Weihe *et al.*, 2006) (Esquema 1).

No SNC, o transportador para DA retira o neurotransmissor do espaço extracelular, controlando a meia-vida da dopamina (Mignini, Streccioni & Amenta, 2003). Por outro lado, transportadores vesiculares de monoaminas (VMAT – *vesicular monoamine transporters*) atuam na mobilização intracelular de DA, sintetizada *de novo* ou captada (Mignini *et al.*, 2006).

Disfunções na secreção de DA podem levar a graves desordens. Enquanto níveis reduzidos de terminais dopaminérgicos são observados em pacientes com a doença de Parkinson, pacientes esquizofrênicos apresentam hiperatividade dopaminérgica (Temlett, 1996; Birtwistle & Baldwin, 1998). Interessantemente, distúrbios imunes têm sido observados em ambos os grupos (Nagai *et al.*, 1996; Wandinger *et al.*, 1999; Ilani *et al.*, 2001).



**Esquema 1. Via de síntese da Dopamina.**

### 1.6.1- Dopamina: papel imunomodulador

Sabe-se que o sistema imune é regulado tanto por fibras nervosas simpáticas centrais quanto periféricas. Esse controle é feito primariamente pelas catecolaminas, como a dopamina (DA), que ao interagir com diferentes células do sistema imune regula muitas de suas funções em resposta a diferentes estressores (Sarkar *et al.*, 2010). Sabe-se que diferentes células imunes expressam receptores para a DA (McKenna *et al.*, 2002; Ferrari *et al.*, 2004; Kirillova *et al.*, 2008; Nakano *et al.*, 2008, 2009a).

A fonte primária de DA capaz de modular a resposta imune periférico provem do plasma, na forma de glicoconjugados ou sulfoconjugados (Cuche *et al.*, 1990), e, em indivíduos saudáveis, chega a 10 pg/mL (Saha *et al.*, 2001a,b). Além disso, os órgãos linfóides primários e secundários possuem inervação

dopaminérgica (Mignini, Streccioni & Amenta, 2003), permitindo que essa catecolamina influencie diferentes eventos imunes periféricos. No entanto, a principal fonte de DA são os neurônios dopaminérgicos do SNC. Em geral, as células imunes não cruzam a barreira hemato-encefálica, mas, no curso de encefalopatias inflamatórias, como a EM, as células imunes efetoras podem entrar no SNC e ter contato com níveis elevados de DA (Owens *et al.*, 1998).

Interessantemente, estudos têm demonstrado que outra fonte de DA provem da síntese a partir de subtipos de células T humanas, particularmente os linfócitos Tregs (Cosentino *et al.*, 2000, Cosentino *et al.*, 2007). Nesses estudos, os autores demonstraram expressão constitutiva da tirosina hidroxilase e armazenamento de quantidades substanciais de DA pelas Tregs, enquanto nos linfócitos T efetores apenas quantidades traços de DA foram detectadas (Cosentino *et al.*, 2000, Cosentino *et al.*, 2007). Porém, não apenas Tregs humanas, mas linfócitos efetores expressam vesículas transportadoras de monoaminas (VMAT – *vesicule monoamine transporter*), o que permite a eles acumular DA em vesículas específicas (Cosentino *et al.*, 2007). Outro achado importante foi a descoberta de que as DCs não apenas expressam receptores de DA como também possuem maquinaria necessária para sintetizar, estocar e liberar DA durante a sinapse imunológica com células T (Nakano *et al.*, 2009a, b; Prado *et al.*, 2012). Devido à proximidade das DCs com as células T, estima-se que a liberação de DA na fenda sináptica imune seja de 100 a 250 nM (Nakano *et al.*, 2009), a mesma concentração que liberada pelos neurônio dopaminérgicos durante as sinapses neurológicas (Wickens & Abuthnott, 2005). Isso implica que as células T virgens e de memória devem ser expostas a concentrações relativamente elevadas durante sua interação com as DC.

Os efeitos da DA sobre o sistema imune são amplos, complexos e ainda pouco explorados em suas bases moleculares. Esses efeitos são dependentes da concentração, do modelo experimental (*in vivo* e *in vitro*) e do subtipo de receptor para DA que é majoritariamente expresso na célula estudada. Dessa forma, a DA pode ser tanto imunoestimulante quanto imunossupressora, dependendo das condições experimentais usadas. Por exemplo, *in vitro*, a DA tem sido destacada em inibir a proliferação e induzir apoptose das células T de indivíduos saudáveis (Bergquist *et al.*, 1997; Ghosh *et al.*, 2003). Bergquist e colaboradores (1994) reportaram que a DA é capaz de suprimir a proliferação e a produção de IFN- $\gamma$  pelas células T de indivíduos saudáveis. Josefsson e colaboradores (1996) e Ghosh e colaboradores (2003) demonstraram que a DA suprime a proliferação das células T e a produção de citocinas por estímulos envolvendo a sinalização via receptor da célula T (TCR – *T cell receptor*). Ademais, Saha e colaboradores (2001) reportaram que a DA, via receptor DAR I, além de reduzir a proliferação, também foi capaz de inibir a citotoxicidade mediada pelas células T CD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> induzida pela IL-2. Estudo por Nakano e colaboradores (2011) demonstrou que receptores do tipo DAR I são expressos especificamente na superfície das células T CD4<sup>+</sup> virgens, determinada fenotipicamente pelos autores como CD45RA<sup>+</sup>. Entretanto, apenas a presença de CD45RA não é mais aceita como marcador universal de células T virgens, uma vez que células T terminalmente diferenciadas, que executam eficientes funções efetoras, voltam a expressar esse marcador na superfície associada à perda da isoforma CD45RO (Saule *et al.*, 2006). Portanto, seguindo as novas regras de identificação fenotípica de células T virgens, determinada pela coexpressão superficial de CD45RA e CCR7, novos estudos são necessários para avaliar o papel da DA em diferentes subtipos de células T. Apesar

dos estudos descritos acima relatarem um efeito inibitório da DA na ativação e função das células T, alguns autores têm demonstrado de forma elegante que agonistas de receptores DAR I favorecem, por outro lado, a diferenciação das células T humanas em células Th17 (Nakano *et al.*, 2008, 2009 e 2011). Para alguns pesquisadores, esse evento deve ser facilitado pelo efeito DA em inibir, via DAR I, a função das células Treg clássicas (Kipnis *et al.*, 2004; Cosentino *et al.*, 2007).

Nesse contexto, estudo publicado pelo nosso grupo demonstrou que doses relacionadas ao estresse de DA amplificaram a produção de citocinas relacionadas ao fenótipo Th17 em culturas de células T policlionalmente ativadas obtidas do sangue periférico de indivíduos que sofrem de transtorno de ansiedade generalizada (Ferreira *et al.*, 2011). Portanto, levando em consideração que o órgão do ataque autoimune na EM seja exatamente o principal sítio anatômico de produção da DA, e que essa catecolamina tem funções imunomoduladoras, faltam estudos sobre o papel da DA no perfil imune das células T de pacientes com EM, mesmo que *in vitro*. Esse tipo de estudo pode nos fornecer valiosas pistas sobre a influência desse neurotransmissor no comportamento funcional das células T envolvidas no curso clínico da doença.

## II- OBJETIVOS

### 2.1- GERAL:

Avaliar o impacto da dopamina (DA) na resposta proliferativa, produção de citocinas e resposta ao glicocorticoide em culturas de células T de pacientes com esclerose múltipla com a forma remitente-recorrente (EM-RR) na fase de remissão clínica.

### 2.2- Objetivos específicos

- Avaliar o impacto da DA na resposta proliferativa de células T ativadas policlonalmente em cultura na presença ou na ausência de DA;
- Quantificar diferentes citocinas nos sobrenadantes das culturas de células mononucleares do sangue periférico em resposta ao ativador policlonal de células T na presença ou na ausência de DA;
- Avaliar o impacto do glicocorticoide na produção de citocinas em culturas de células contendo células T policlonalmente ativadas na ausência ou na presença de DA;
- Identificar a participação de diferentes subtipos de célula T no efeito imunomodulador da DA *in vitro*.
- Avaliar o papel da produção endógena de IL-6 na produção de citocinas relacionadas ao fenótipo Th17.

### **III- METODOLOGIA**

#### **3.1- Pacientes:**

Para nosso estudo, 25 pacientes com diagnóstico fechado de esclerose múltipla com a forma recorrente remitente (EM-RR) na fase de remissão clínica foram recrutados a partir do serviço de Neurologia do Hospital da Lagoa (RJ), coordenado pela investigadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Regina Maria Papais Alvarenga, médica neurologista e professora associada de Neurologia da UNIRIO. Informações quanto idade, gênero, tempo de doença e grau de incapacidade neurológica foram obtidas a partir do prontuário do paciente. Como controle da normalidade quanto ao perfil imunológico, 20 indivíduos saudáveis pareados por sexo e idade foram incluídos em nosso estudo.

Esse estudo foi aprovado pelo comitê e Ética da UNIRIO e as amostras de sangue periférico só foram colhidas após cada paciente ter dado sua permissão oral e por escrito através da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexos).

#### **3.2- Coleta e purificação de células mononucleares do sangue**

Para o nosso estudo, aproximadamente 20 mL de sangue periférico foram colhidos utilizando agulhas e tubos estéreis contendo heparina ou em seringas heparinizados (BD Vacutainer, Franklin Lakes, NY). Imediatamente após a coleta, o sangue foi encaminhado até o laboratório de Imunofisiologia e Imunopatologia dos Linfócitos T. A partir do sangue total obtivemos os plasmas e as células mononucleares do sangue periférico (CMSP), através da centrifugação, a 2.000 rpm por 20 minutos, do sangue total sobre um gradiente de densidade Fycoll-Hypaque.

Enquanto os plasmas foram recolhidos e congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$ , as CMSP colhidas foram lavadas 3 vezes com solução de HANK e contadas em azul de trypan, usando uma câmara de Neubauer. Para os experimentos funcionais, a concentração de CMSP viáveis foi ajustada para  $1 \times 10^6/\text{mL}$ .

### **3.3- Cultura das células mononucleares do sangue e estímulos**

As células foram cultivadas em placa de 96 poços de fundo chato em 0,2 mL de meio RPMI 1640 completo ou numa placa de 24 poços de fundo chato em 1 mL de meio RPMI 1640 completo. O meio RPMI 1640 é considerado completo quando se adiciona 2 mM de L-glutamina (GIBCO, Carlsbad, CA, USA), 10% de soro fetal bovino, 20 U/ml de penicilina, 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de estreptomicina e 20 mM de tampão HEPES. A fim de induzir a ativação policlonal das células T, todas as culturas de CMSP ( $1 \times 10^6/\text{mL}$ ) foram mantidas por 3 dias com fitohemaglutinina (PHA,  $1\mu\text{g}/\text{mL}$ ), tempo correspondente ao pico de resposta das células T à PHA.

Em alguns experimentos, as células T  $\text{CD4}^+$  ou  $\text{CD8}^+$  foram selecionadas negativamente utilizando kit de seleção negativa da MACS MiltenyiBiotec. Para tanto,  $1 \times 10^7/\text{mL}$  de CMSP foram magneticamente marcadas com anticorpos anti-CD4 ou ainda anti-CD8 MACS MicroBeads e aplicadas em uma coluna MACS posicionada sobre um MACS separador. Células marcadas ficam presas enquanto as células não marcadas são recuperadas através da lavagem das colunas com solução tampão fornecida pelo fabricante. Através da citometria de fluxo verificamos que a eficácia desse procedimento foi de aproximadamente 1-2,8 % de células T  $\text{CD8}^+$  (valor médio antes do tratamento com anti-CD8 foi de  $29,2 \pm 4,3$ ), e 2-3,3% de células T  $\text{CD4}^+$  (valor médio antes do tratamento com anti-CD4 foi de  $48,1 \pm 8,1$ ), das CMSP.

Finalmente, alguns experimentos foram conduzidos utilizando culturas de células enriquecidas de linfócitos CD4<sup>+</sup>. Para tanto, as células (1 x 10<sup>7</sup>/mL) previamente marcadas com IgG1 de camundongo anti-CD4 foram removidas da coluna MACS e deixadas em meio RPMI completo à 37 °C/5% de CO<sub>2</sub>. No dia seguinte, os anticorpos IgG1 murinos anti-CD4 contendo esferas magnéticas foram removidos da suspensão celular através da centrifugação à 2.000 rpm por 10 minutos. As células enriquecidas de linfócitos T CD4<sup>+</sup> foram lavadas mais uma vez com meio completo a temperatura ambiente através da centrifugação à 2000 rpm/10 minutos. Finalmente, a suspensão celular foi contada em azul de trypan e ajustada para 1 x 10<sup>6</sup>/mL.

Nos experimentos objetivando avaliar o papel da produção endógena de IL-6 na produção de citocinas relacionadas ao fenótipo Th17, 100 µg/mL de anticorpo anti-IL-6, chamado tocilizumab (Actemra, Hoffmann-La Roche), ou isotipo controle (IgG1) foram adicionados às culturas no início do tempo de incubação. Esse anticorpo monoclonal foi desenvolvido para tratar pacientes com artrite reumatoide e a dose de referência utilizada nesse estudo foi retirada do trabalho executado por Mihara e colaboradores (2005), cujo objetivo foi avaliar a atividade biológica do tocilizumab em inibir o efeito da IL-6 recombinante humana em culturas de células B humanas.

O efeito da DA nos nossos eventos imunes induzidos por PHA foi avaliado após a adição de doses relacionadas ao estresse dessa catecolamina (1x10<sup>-7</sup> M e 1x10<sup>-6</sup> M) diluída em SFB (soro fetal bovino) (Maestroni & Mazzola, 2003; Cosentino *et al.*, 2004). Como nos primeiros experimentos não houve diferença significativa nos eventos imunes mediados pelas duas diferentes doses de DA, nós resolvemos dar continuidade aos nossos estudos com a maior dose desse neurotransmissor (1x10<sup>-6</sup> M). Finalmente, o impacto dos glicocorticoides (utilizado no controle das crises clínicas) nos eventos imunes estudados foi avaliado através da adição às culturas de

dose farmacológica de hidrocortisona ( $1 \times 10^{-6}$  M) (Agarwal & Marshall, 1998) (Sigma Chemicals, St Louis, MD). Todas as culturas de células foram incubadas em uma estufa úmida a 37°C em atmosfera a 5% de CO<sub>2</sub>.

### **3.4- Ensaio de proliferação celular**

Culturas de CMSP ( $1 \times 10^6$ /mL) foram mantidas estimulados por 3 dias com PHA (1µg/mL) na presença ou na ausência de DA ( $1 \times 10^{-6}$  M), e o nível de proliferação das células T foi determinado através da incorporação do nucleotídeo timidina tritiada ([<sup>3</sup>H] TdR, 4 µCi/poço) adicionado às culturas 8 horas antes do término da incubação de 3 dias. As células foram recolhidas utilizando um coletor automático e a incorporação da timidina no DNA foi aferida utilizando líquido de cintilação. Os resultados são apresentados como média ± desvio-padrão da contagem por minuto (cpm).

### **3.5- Determinação de Citocinas**

A fim de se dosar o conteúdo de citocinas *in vitro*, os sobrenadantes das culturas de CMSP submetidas a diferentes condições experimentais foram analisados pela técnica de ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) usando kits BD OptEIA seguindo as instruções do protocolo fornecido pelo fabricante (BD, Pharmigen, San Diego). Brevemente, 50,0 µL dos sobrenadantes (diluídos 1:10) foram adicionados a cada poço contendo anticorpo primário anti-citocina. Após 2 horas de incubação, 100,0 µL do anticorpo secundário (previamente tratado com a enzima conjugada estreptavidina-horseradish peroxidase) foram adicionados em cada poço e adicionalmente incubados por 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, 100,0 µL de substrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) foram adicionados aos poços e a reação foi revelada 30 minutos

após através da adição de uma solução de parada (ácido fosfórico a 1,0 M). As placas foram lidas a 450 nm em leitor de ELISA (Dy nex Technologies, USA). Para o nosso estudo, nós dosamos as seguintes citocinas: IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-4, IL-5, IL-21, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-17. Citocinas humanas recombinantes variando de 10-500 pg/mL foram usadas para construir curvas-padrão.

### **3.6- Análise estatística**

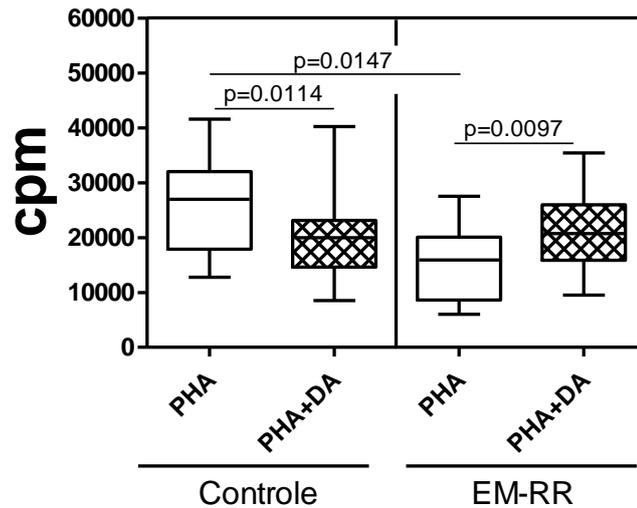
Todas as análises estatísticas dos ensaios de proliferação e dosagem de citocinas foram conduzidas usando o programa de gráfico GraphPad Prism versão 5.0 para Windows (GraphPad). O teste não-paramétrico de Mann-Whitney U foi utilizado para determinar se os dois grupos eram estatisticamente diferentes para cada variável dada. O teste de t de Student foi aplicado para verificar se uma determinada variável era estatisticamente diferente entre os indivíduos do mesmo grupo. A correlação de Spearman foi utilizada para avaliar a relação entre a produção de citocinas e o grau de incapacidade neurológica do paciente, aferido pela pontuação do EDSS. A significância em todos os experimentos foi definida como  $p < 0,05$ .

## IV- RESULTADOS

### 4.1- Impacto da dopamina na resposta proliferativa das células T de pacientes com EM-RR

Para investigar o impacto da dopamina (DA) em alguns eventos imunes mediados por células T de pacientes com EM-RR na fase de remissão clínica, amostras de sangue periférico foram colhidas e comparadas com os resultados obtidos a partir de amostras obtidas de indivíduos saudáveis.

O primeiro evento imune analisado neste estudo foi a proliferação das células T através da medida do nível de captura de timidina ( $[^3\text{H}]$  TdR). Vale ressaltar que, em nenhum dos grupos estudados, nenhuma proliferação celular foi detectável nas culturas de células não estimuladas ou mantidas na presença de DA (dados não mostrados). Como podemos observar na figura 1, o nível de captura de  $[^3\text{H}]$  TdR foi menor nas culturas de pacientes com EM-RR quando comparado ao grupo controle ( $p= 0,0147$ ). A adição de DA exerceu efeitos opostos sobre a resposta proliferativa das células T policlonalmente ativadas obtidas de pacientes com EM-RR e de indivíduos saudáveis. Nesse sentido, enquanto a DA reduziu significativamente a captura de timidina nas culturas controle, essa catecolamina elevou a expansão policlonal das células T de pacientes com EM-RR (Fig. 1).



**Figura 1. Efeito *in vitro* da dopamina (DA) sobre proliferação das células T**  
**células de pacientes com EM-RR.** CMSP ( $1 \times 10^6$ /mL) purificadas de pacientes com esclerose múltipla recorrente remitente (EM-RR) ( $n=20$ ) e indivíduos saudáveis (controle,  $n=20$ ) foram mantidas por 3 dias em cultura na presença de PHA ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) ou PHA mais DA ( $1 \times 10^{-6}$  M). O índice de proliferação foi avaliado através da captura de  $[^3\text{H}]$  TdR. Na figura, as linhas horizontais dentro das caixas correspondem à mediana, os limites das caixas correspondem aos percentuais 25 e 75, e as linhas verticais indicam o intervalo. Os valores de  $p$  estão indicados na figura.

#### **4.2- Efeito da DA no perfil de citocinas pró-inflamatórias produzidas pelas células T de pacientes com EM-RR**

O tipo de resposta imune adquirida mediada pelas células T é principalmente determinado pelo padrão de citocinas produzidas por esses linfócitos. Portanto, nosso próximo passo foi avaliar o perfil de citocinas produzido pelas culturas de CSMP ativadas com PHA na presença e na ausência de DA. Mais uma vez é importante ressaltar que não foi observada produção detectável de citocinas nas

culturas de CMSP obtidas dos dois grupos experimentais quando mantidas só em meio de cultura ou na presença de apenas de DA (dados não demonstrados).

Seguindo a estimulação das culturas de CMSP com PHA, nossos resultados mostrados na Figura 2A revelaram que, com relação ao fenótipo Th1, nenhuma diferença foi observada na produção de IL-2 e IFN- $\gamma$  nos grupos estudados. Nesse sistema, enquanto a DA reduziu os níveis de IL-2 e IFN- $\gamma$  nas culturas controles, esse neurotransmissor elevou a produção de IFN- $\gamma$  pelos linfócitos T de pacientes com EM-RR (Fig. 2A).

Com relação à produção de citocinas definidoras do fenótipo Th2, nenhuma diferença significativa foi observada na produção de IL-4 e IL-5 em resposta ao PHA nos dois grupos estudados (Fig. 2B). A adição de DA não foi capaz de modificar o padrão de secreção dessas citocinas em culturas controles e de pacientes com EM-RR (Fig. 2B).

Finalmente, quando a quantificação das citocinas relacionadas ao fenótipo Th17 foi conduzida, nós observamos que a produção de IL-6 e TNF- $\alpha$  foi significativamente superior nas culturas de pacientes com EM-RR, quando comparado ao controle. A adição de DA, no entanto, aumentou a produção dessas citocinas em ambos os grupos. Nenhuma diferença foi observada quanto à produção de IL-1 $\beta$  nos grupos estudados. Com relação às citocinas definidoras do fenótipo Th17, enquanto a produção de IL-21 não foi estatisticamente diferente entre os diferentes grupos experimentais, a liberação de IL-17 foi significativamente superior nos sobrenadantes recolhidos das culturas de CMSP contendo linfócitos T ativados de pacientes com EM-RR (Fig. 3). A adição de DA foi capaz de aumentar a síntese e liberação *in vitro* de ambas citocinas apenas nos pacientes com EM-RR. Interessantemente, em nosso estudo, uma correlação positiva foi observada entre os

níveis de IL-17 e IL-6, dosados nas culturas contendo apenas células T ativadas de pacientes com EM-RR (sem dopamina), e grau de incapacidade neurológica dos pacientes (aferidos pela pontuação do EDSS) (Fig. 04).

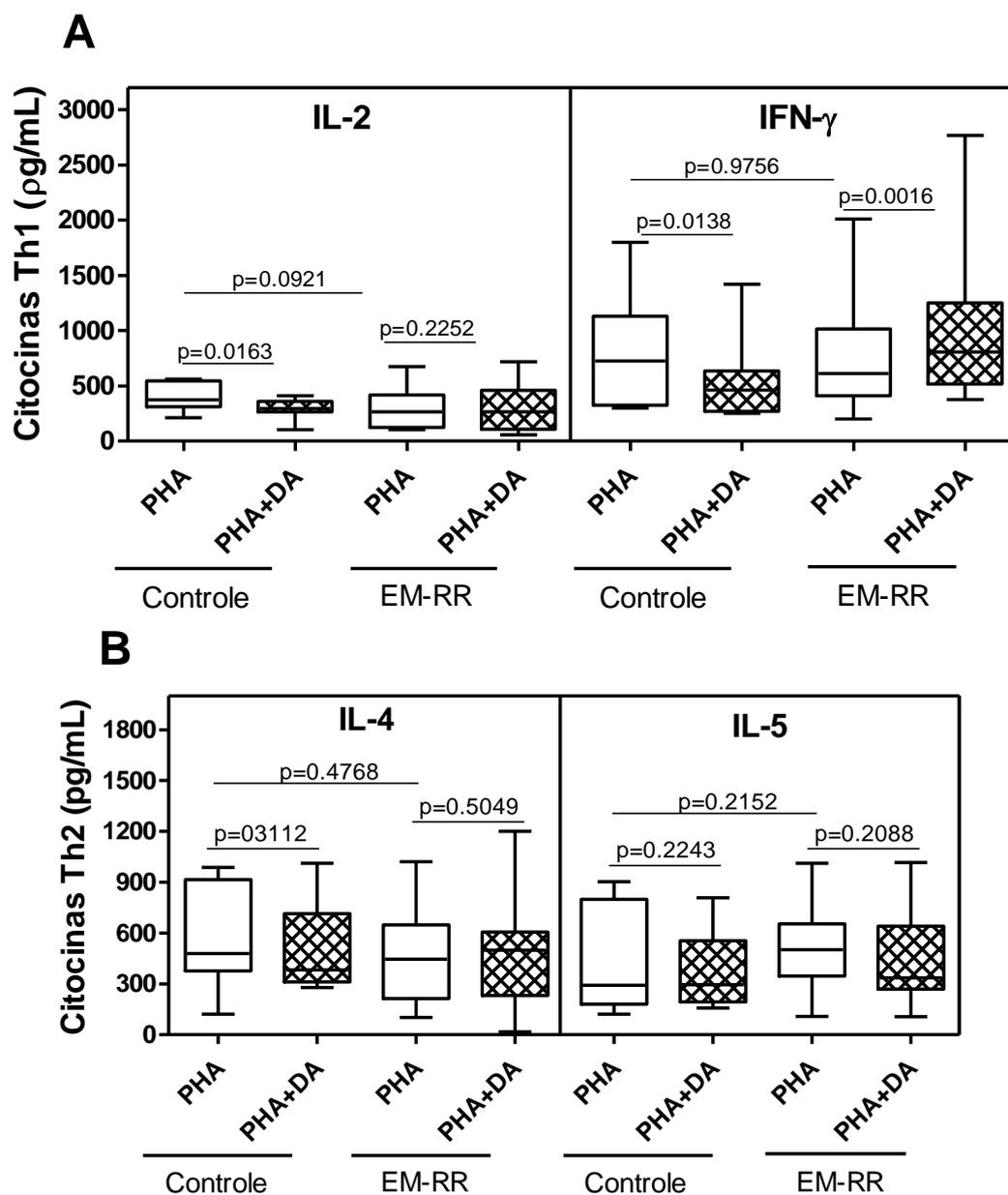
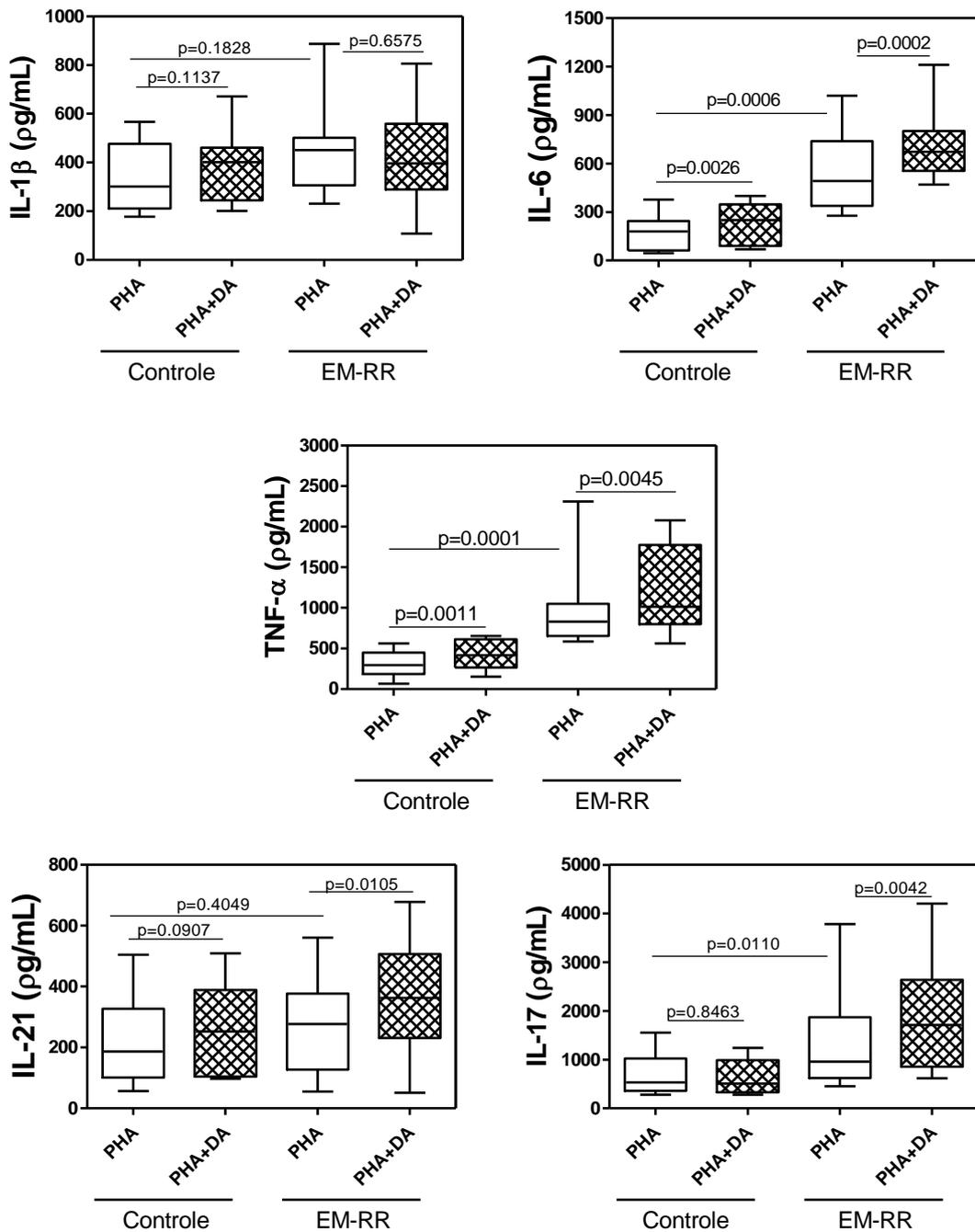


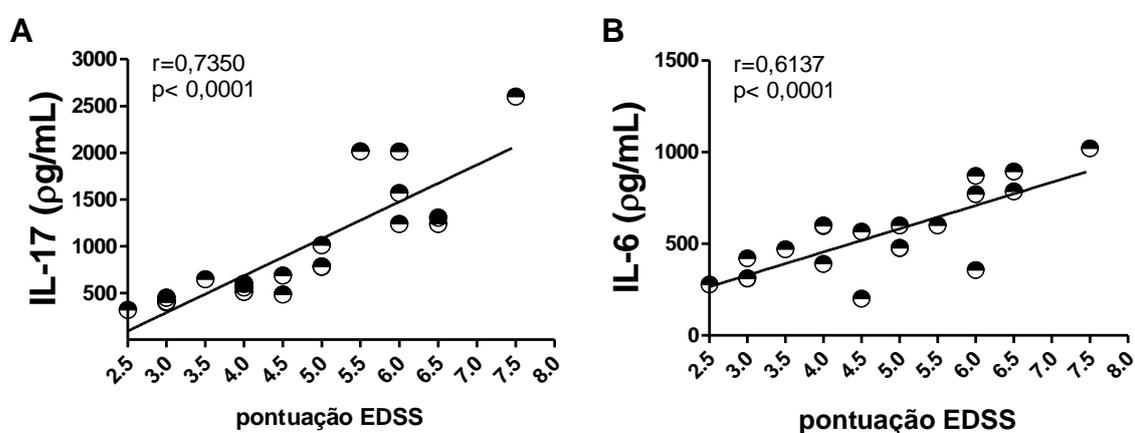
Figura 2. Análise do perfil *in vitro* de citocinas do tipo Th1 e Th2 em pacientes com EM-RR na presença ou na ausência de dopamina (DA). A PHA (1µg/ml), sozinha ou na presença de DA (1x10<sup>-6</sup>M), foi adicionada às culturas de

CMSP ( $1 \times 10^6/\text{mL}$ ) obtidas de indivíduos controles ( $n=20$ ) ou de pacientes com esclerose múltipla recorrente remitente (EM-RR) ( $n=20$ ) e os sobrenadantes foram recolhidos após 3 dias para determinação de diferentes citocinas através do ELISA. Na figura, **[A]** indica citocinas típicas do fenótipo Th1 (IL-2 e IFN- $\gamma$ ) e em **[B]** destaca citocinas do tipo Th2 (IL-4 e IL-5). Na figura, as linhas horizontais dentro das caixas correspondem à mediana, os limites das caixas correspondem aos percentuais 25 e 75, e as linhas verticais indicam o intervalo. Os valores de  $p$  estão indicados na figura.



**Figura 3. Impacto da dopamina (DA) na produção *in vitro* de citocinas relacionadas ao fenótipo Th17 de pacientes com EM-RR.** A PHA (1µg/ml), sozinha ou na presença de DA (1x10<sup>-6</sup>M), foi adicionada às culturas de CMSP (1x10<sup>6</sup>/mL) obtidas de indivíduos controles (n=20) ou de pacientes com esclerose múltipla recorrente remitente (EM-RR) (n=20) e os sobrenadantes foram

recolhidos após 3 dias para determinação de diferentes citocinas através do ELISA. Na figura indica a dosagem das citocinas relacionadas (IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ) e específicas (IL-21 e IL-17) do fenótipo Th17. Na figura, as linhas horizontais dentro das caixas correspondem à mediana, os limites das caixas correspondem aos percentuais 25 e 75, e as linhas verticais indicam o intervalo. Os valores de  $p$  estão indicados na figura.

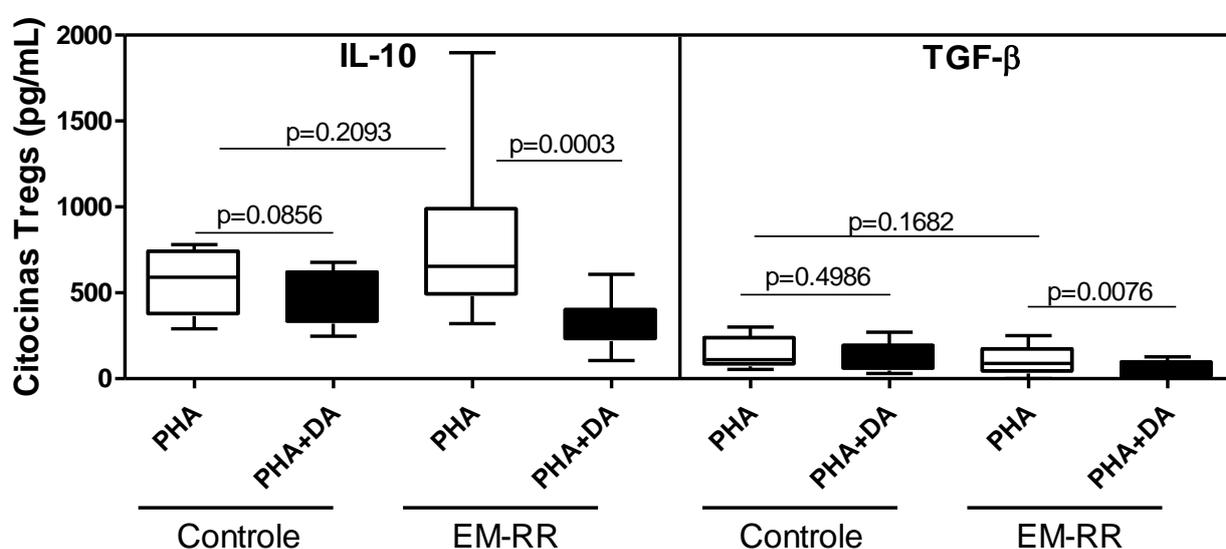


**Figura 4: Correlação entre os níveis de IL-17 e IL-6 e a pontuação do EDSS dos pacientes com EM-RR.** A figura destaca forte correlação positiva entre os níveis de IL-17 (A) e IL-6 (B), produzidos por culturas de CMSP ( $1 \times 10^6$ /mL) contendo linfócitos T policlonalmente ativados, e a pontuação do EDSS (*dados obtidos a partir do prontuário médico*).

#### 4.3- Impacto da dopamina em modular a produção de citocinas anti-inflamatórias

Em geral, o desenvolvimento de doenças autoimunes tem sido atrelado a um dano nos mecanismos imunes de autotolerância, tal como deficiência na produção

de citocinas anti-inflamatórias pelas células T reguladoras (Tregs) (Costantino, Baecher-Allan & Hafler, 2008). Entretanto, como demonstrado na figura 5, nenhuma diferença foi observada nos níveis de IL-10 e TGF- $\beta$  produzidos em ambos os grupos. Interessantemente, apesar da adição da DA não ter alterado de forma significativa a liberação de IL-10 e TGF- $\beta$  nas culturas controles, essa catecolamina reduziu de forma significativa a produção de ambas as citocinas nas culturas contendo células T ativadas obtidas de pacientes com EM-RR (Fig. 5).



**Figura 5. Impacto da dopamina (DA) na produção *in vitro* de citocinas relacionadas ao fenótipo Treg de pacientes com EM-RR.** A PHA (1 $\mu$ g/ml), sozinha ou na presença de DA (1 $\times 10^{-6}$ M), foi adicionada às culturas de CMSP (1 $\times 10^6$ /mL) obtidas de indivíduos controles (n=20) ou de pacientes com esclerose múltipla recorrente remitente (EM-RR) (n=20) e os sobrenadantes foram recolhidos após 3 dias para determinação de diferentes citocinas através do ELISA. Na figura indica a dosagem das citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- $\beta$ ). Na figura, as linhas horizontais dentro das caixas correspondem à mediana, os limites das caixas

correspondem aos percentuais 25 e 75, e as linhas verticais indicam o intervalo. Os valores de  $p$  estão indicados na figura.

#### 4.4- Efeito modulador do glicocorticoide na produção de IL-17 pelas células T ativadas de pacientes com EM-RR cultivadas na presença de dopamina

Nos pacientes com EM em surto, pulsoterapia com corticoides ajuda a controlar as crises de déficit neurológico por inibir as células do sistema imune, bloqueando assim a produção de citocinas e de outros mediadores inflamatórios envolvidos nas lesões neuronais (revisto por Lana-Peixoto *et al.*, 2002). Portanto, nosso próximo objetivo foi avaliar o impacto da DA em modular a capacidade da hidrocortisona (HC) em inibir a produção *in vitro* de IL-17. Como demonstrado na figura 6, enquanto a produção de IL-17 foi dramaticamente reduzida nas culturas contendo células T policlionalmente ativadas de indivíduos saudáveis (com ou sem DA), a liberação dessa citocina foi menos sensível a inibição a HC, principalmente após a adição da DA.

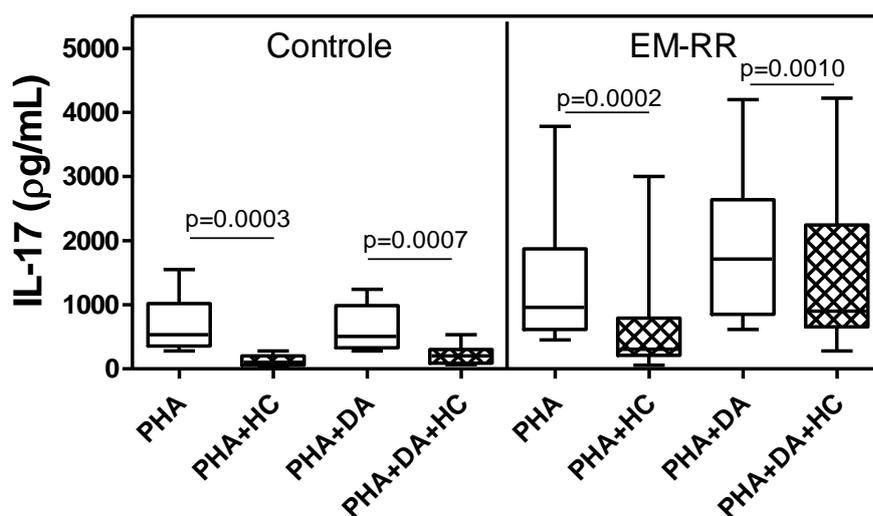


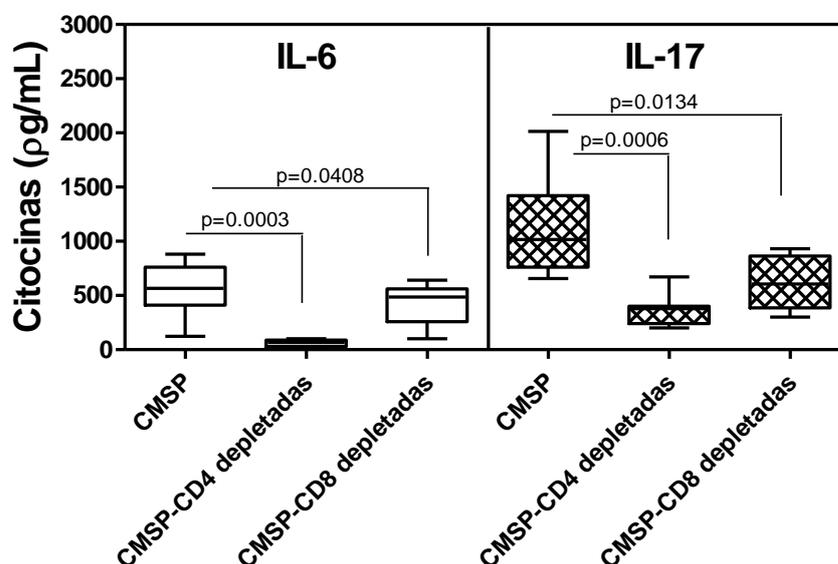
Figura 6. Modulação da produção de IL-17 pelas células T de pacientes com EM-RR ativadas na presença de DA pelo glicocorticoide. CMSP ( $1 \times 10^6$ /mL)

obtidas de indivíduos saudáveis (controle, n=20) ou de pacientes com esclerose múltipla recorrente remitente (EM-RR) (n=20) foram mantidas em cultura por 3 dias na presença de PHA (1µg/ml) mais DA ( $1 \times 10^{-6}$  M). Para avaliar o efeito do glicocorticoide na produção de IL-17 em culturas de células estimuladas com PHA mais DA, doses relacionadas ao estresse de hidrocortisona (HC,  $1 \times 10^{-5}$  M) foram adicionadas no início das culturas de CSMP. Na figura, as linhas horizontais dentro das caixas correspondem à mediana, os limites das caixas correspondem aos percentuais 25 e 75, e as linhas verticais indicam o intervalo. Após 3 dias, os sobrenadantes foram recolhidos e as dosagens de IL-17 foi realizada através da técnica ELISA. Os valores de *p* estão indicados na figura.

#### **4.5- Papel diferencial dos subtipos de células T e do receptor para IL-6 na produção de citocinas em culturas de células de EM-RR em resposta à dopamina.**

Níveis elevados de IL-6 e IL-17 foram dosados nos sobrenadantes das culturas de CMSP de pacientes com EM-RR e foram positivamente relacionados à evolução da doença. Nosso último passo foi, então, avaliar a contribuição de diferentes subpopulações de células T na produção dessas citocinas através da depleção de células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> utilizando anticorpos anti-CD4 e anti-CD8 marcados com esferas magnéticas (ver metodologia). Como pode ser observada na figura 7, a remoção das células T CD4<sup>+</sup> das CMSP reduziu dramaticamente a produção de IL-17 e, principalmente, da IL-6. Apesar da depleção das células T CD8<sup>+</sup> ter atenuado a produção de ambas citocinas em culturas de CMSP ativadas com PHA, seu

envolvimento na produção de IL-6 e IL-17 foi expressivamente inferior ao papel das células T CD4<sup>+</sup> de pacientes com EM-RR em nosso sistema.

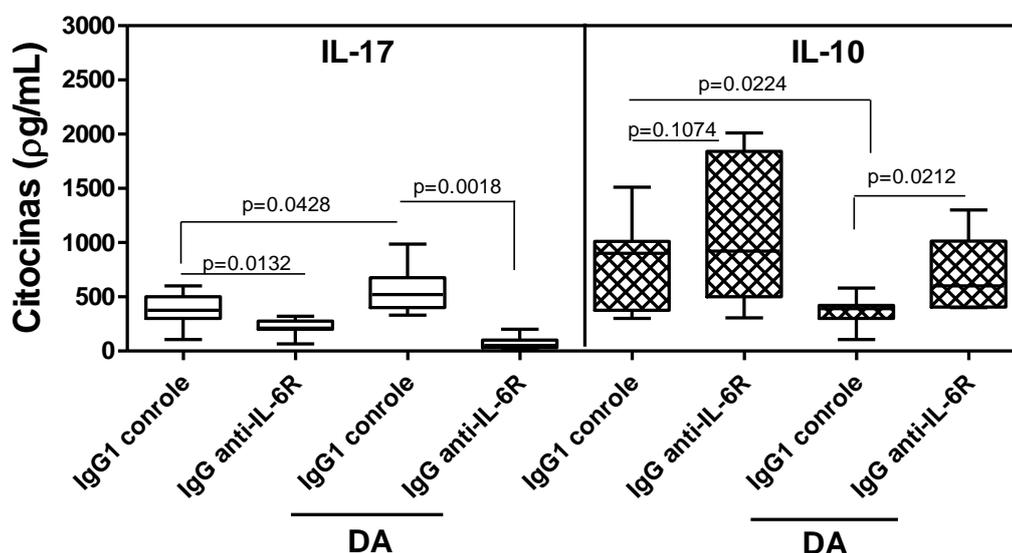


**Figura 7: Papel das células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> na produção de IL-6 e IL-17 em pacientes com EM-RR.** Culturas de CMSP totais de pacientes com EM-RR (n=10), ou depletadas de células CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> ( $1 \times 10^6$ /mL), através de seleção negativa (*ver metodologia*), foram mantidas em culturas por 3 dias na presença de PHA (1µg/ml) e DA ( $1 \times 10^{-6}$  M). Após 3 dias, os sobrenadantes foram recolhidos e as dosagens de IL-6 e IL-17 foram realizadas através da técnica ELISA. Na figura, as linhas horizontais dentro das caixas correspondem à mediana, os limites das caixas correspondem aos percentuais 25 e 75, e as linhas verticais indicam o intervalo. Os valores de *p* estão indicados na figura.

Como demonstrado previamente, a produção de IL-6 foi superior na cultura de CMSP de pacientes com EM-RR, quando comparado ao grupo controle. Ademais,

a adição de DA amplificou a sua produção. Portanto, sabendo que a IL-6 potencializa a diferenciação e função das células Th17 humanas (revisto por Camporeale & Poli, 2012), nosso último objetivo foi avaliar a contribuição da sinalização via receptor para IL-6 (IL-6R) na produção de IL-17 em culturas enriquecidas de células T CD4<sup>+</sup> ativadas com PHA sem ou com DA.

Como demonstrado na figura 8, bloqueio da sinalização via IL-6R diminuiu a produção de IL-17, principalmente nas culturas de células T CD4<sup>+</sup> dos pacientes ativadas na presença de DA. Ademais, bloqueio da sinalização via IL-6R reduziu a resposta proliferativa induzida pela PHA sem DA ( $10.501 \pm 4.101$  x  $6.036 \pm 2.501$  cpm,  $p=0.0391$ ) e, principalmente com DA ( $10.501 \pm 4.101$  x  $3.781 \pm 1.337$  cpm,  $p < 0.0001$ ). Finalmente, esse evento foi atrelado a um aumento significativo na produção de IL-10 apenas nas culturas dos pacientes.



**Figura 8: Envolvimento da sinalização via IL-6R na produção de IL-17 e IL-10 pelas células T CD4<sup>+</sup> de pacientes com EM-RR. Culturas enriquecidas de**

células CD4<sup>+</sup> ( $1 \times 10^6$ /mL) (*ver metodologia*) de pacientes com EM-RR (n=06) foram mantidas em culturas por 3 dias na presença de PHA (1µg/ml) e DA ( $1 \times 10^{-6}$  M). O bloqueio da sinalização via IL-6R foi realizado adicionando 100µg/mL de anticorpo monoclonal anti-IL-6R no tempo zero (início da cultura) e 48 horas após. No final de 3 dias, os sobrenadantes foram recolhidos e as dosagens de IL-17 e IL-10 foi realizada através da técnica ELISA. Na figura, as linhas horizontais dentro das caixas correspondem à mediana, os limites das caixas correspondem aos percentuais 25 e 75, e as linhas verticais indicam o intervalo. Os valores de *p* estão indicados na figura.

## V- DISCUSSÃO

A esclerose múltipla (EM) é uma doença desmielinizante do sistema nervoso central (SNC) de mediação celular com domínio do fenótipo Th17 cujos alvos são peptídeos das proteínas da mielina e do oligodendrócito, célula formadora da bainha de mielina (Lovett-Racke, Yang & Rocke, 2011). Apesar de apresentar diferentes cursos, a forma recorrente-remitente (EM-RR) é o curso clínico mais comum da EM.

Como outras doenças autoimunes, a patogênese da EM envolve a combinação de diferentes fatores genéticos e ambientais (Selmi *et al.*, 2012) que deve favorecer não apenas o início da doença como também o risco de recaídas. Um desses fatores de risco é o nível de estresse no qual o paciente é condicionado (revisto por Stojanovich & Marisavljevich, 2008). Durante o estresse a produção de catecolaminas, como a dopamina (DA), é elevada (revisto por Sabban & Kvetňanský, 2001). Esse fato tem importância particular no caso da EM, cujo sítio de autoagressão é exatamente o local de maior produção de DA, o SNC. Portanto, o objetivo maior desse estudo foi avaliar o impacto da DA no perfil funcional das células T de pacientes com EM-RR na fase de remissão clínica.

Nosso primeiro objetivo foi avaliar a capacidade da DA em regular a resposta proliferativa das células T ativadas policlonalmente com a fitohemaglutinina A (PHA), um poderoso mitógeno de células T humanas. Em nosso sistema, o nível da linfoproliferação foi menor nas culturas de pacientes com EM-RR, quando comparado ao grupo controle. Enquanto a DA diminuiu a expansão policlonal das células T nas culturas controles, essa catecolamina elevou a linfoproliferação dos pacientes com EM-RR. Estudos têm demonstrado que DA inibe a proliferação *in vitro* de células T de indivíduos saudáveis em resposta ao anticorpo anti-CD3 mais IL-2

(Saha *et al.*, 2001a,b). Em nosso sistema, um provável motivo pelo qual a DA reduziu a capacidade proliferativa das células T ao ativador policlonal PHA nas culturas controles deve estar relacionado à habilidade desse neurotransmissor em reduzir a produção de IL-2, como observado em nosso estudo. Ghosh e colaboradores (2003) demonstraram que DA, através dos DAR I, reduz a expressão das proteínas tirosina cinases Lck e Fyn em células T policlionalmente ativadas, enzimas estas necessárias à síntese de IL-2 seguindo a ativação das células T via TCR (Mills *et al.*, 1993). A demonstração que a DA exerceu efeito oposto nas culturas de células T de pacientes com EM-RR pode estar relacionada a dois diferentes motivos, não excludentes: (1) a modulação de diferentes receptores de DA na superfície das células T dos pacientes com EM e/ou (2) amplificação da produção de citocinas envolvidas na proliferação das células com fenótipo Th17, tais como IL-6 e IL-21 (Nurieva *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2007). De fato, em nosso modelo, bloqueio da sinalização pelo IL-6R diminuiu a resposta proliferativa das células T CD4<sup>+</sup> ativadas na presença de DA. No momento atual, alguns experimentos estão sendo desenhados objetivando delinear, por citometria de fluxo, o padrão de expressão dos diferentes tipos de receptores para DA nas células T de indivíduos saudáveis e de pacientes com EM.

Sabe-se que diferentes tipos de resposta imune adquirida são executados por diferentes fenótipos de células T. A resposta Th1, por exemplo, é caracterizada pela produção de IL-2 e IFN- $\gamma$ , e está envolvida principalmente na resposta contra micro-organismos intracelulares (Gutcher & Becher, 2007). Por outro lado, células Th2 humanas produzem elevadas quantidades de IL-4, IL-5 e IL-13 e são requeridas no controle dos helmintos por estimular mastócitos e eosinófilos, bem como por induzir as células B a produzir IgE (Ekkens *et al.*, 2003). Estudo realizado

por Ghosh e colaboradores (2003) demonstrou que a liberação de citocinas relacionadas aos fenótipos Th1 e Th2 por células T de indivíduos saudáveis em resposta ao anticorpo anti-CD3 foi inibida pela DA. Em nosso estudo, apesar da adição de DA ter diminuído a produção de IFN- $\gamma$  e IL-2 em culturas de células obtidas de indivíduos saudáveis, essa catecolamina não alterou a produção de citocinas relacionadas ao fenótipo Th2. Até o momento, não temos uma explicação para essa diferença entre os nossos dados e estudo de Ghosh e colaboradores (2003). Entretanto, em nosso estudo foram excluídos indivíduos com diagnóstico de reações alérgicas clássicas mediadas por IgE, mesmo que fossem casos leves de rinite alérgica, que é muito prevalente na população em geral. No trabalho realizado por Ghosh e colaboradores (2003) esta informação, no entanto, não foi fornecida, deixando em aberto se essa diferença observada no fenótipo Th2 residiria nos critérios de seleção dos indivíduos controles.

Assim como observado na resposta proliferativa das células T, o efeito da DA no perfil de citocina nas culturas contendo células T policlionalmente ativadas de pacientes com EM-RR foi diferente em vários aspectos. Nesse contexto, a adição de DA potencializou a produção de IFN- $\gamma$ . Com relação à produção de citocinas típicas do fenótipo Th2, nenhuma diferença foi observada seguindo a adição da DA. Esses resultados sugerem que, quando comparado ao fenótipo Th1, células do tipo Th2 (IL-4 e IL-5) parecem ser menos sensíveis a adição da DA.

Em nosso estudo, um achado muito interessante foi observado quando avaliamos o efeito da DA na produção de citocinas relacionadas ao fenótipo Th17. As células Th17, quando ativadas, produzem níveis elevados de IL-17 (também chamada de IL-17A), IL-21, IL-22, IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , e, com a ajuda das células Th1, executam papel importante na resposta imune contra certos patógenos,

particularmente bactérias extracelulares e fungos (Jovanovic *et al.*, 1998; Gutcher & Becher, 2007; Matsuzaki & Umemura, 2007). Por outro lado, domínio do fenótipo Th17 tem sido igualmente implicado na gênese das doenças autoimunes, tal como EM (revisto por Lovett-Racke, Yang, Racke, 2011). Nossos resultados demonstraram que, quando comparado ao grupo controle, culturas de células ativadas com PHA de pacientes com EM-RR produziram níveis significativamente superiores de citocinas relacionadas ao fenótipo Th17: a IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-17. Interessantemente, em nosso sistema, uma correlação positiva foi observada entre os níveis de IL-17 e IL-6, produzidos pelas células T ativadas, e o grau de incapacidade neurológica do paciente, como aferido pela pontuação do EDSS. Esses resultados denunciam que, mesmo na remissão clínica, o domínio do fenótipo Th17 está atrelado ao curso da doença.

Quanto ao fenótipo Th17, adição de DA amplificou a produção não apenas IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-17, bem como da IL-21. Nas culturas de indivíduos saudáveis, apesar da adição de DA também ter elevado, em menor extensão, a produção de citocinas relacionadas (IL-6 e TNF- $\alpha$ ), esse neurotransmissor não foi capaz de modular a secreção de citocinas específicas do fenótipo Th17. Esses resultados sugerem que DA favorece o fenótipo envolvido na própria imunopatogênese da EM, o fenótipo Th17.

Interessantemente, estudo por Nakano e colaboradores (2008) demonstrou que DA induz a diferenciação das células T virgens em Th17 através do receptor DAR I D1 e que um antagonista desse receptor foi capaz de atenuar EAE por reduzir a produção de IL-17. Antagonistas de DAR I D1, tal como SCH-23390, têm reduzido a severidade de outras doenças autoimunes em modelos experimentais,

tais como diabetes (Hashimoto *et al.*, 2009) e nefrite sérica nefrotóxica (Okada *et al.*, 2009).

Nesse mesmo estudo de Nakano e colaboradores (2008), antagonistas de DAR II, por outro lado, favoreceram o fenótipo Th17 *in vitro* e amplificaram a deterioração neurológica em camundongos com EAE. Interessantemente, a expressão do receptor para DAR II é reduzido na superfície das células T de pacientes com lúpus, quando comparado a indivíduos saudáveis (Jafari *et al.*, 2012). Esses resultados sugerem que diferentes subtipos de receptores para DA podem ser utilizados para modular a resposta mediada por Th17.

Em nosso estudo, experimentos conduzidos após a depleção seletiva de diferentes subtipos de células T demonstraram que as células T CD4<sup>+</sup> são os principais alvos da DA. Ademais, o incremento na produção de IL-17 e redução na liberação de IL-10 pela DA foi dependente da sinalização via IL-6R. Nakano e colaboradores (2011) demonstraram que DA foi capaz de aumentar a expressão de mRNA para ROR-C, importante fator de transcrição envolvido na diferenciação das células T em Th17, e produção de IL-17 por células T CD4<sup>+</sup> virgens ativadas em cultura na presença de anti-CD3/anti-CD28. Nesse estudo, a produção de IL-17 foi completamente inibida pela adição de tocilizumab (anticorpo monoclonal anti-IL-6R). Sabe-se que agonistas de DAR I aumentam as concentrações citoplasmáticas de cAMP, e a região promotora do gene para IL-6 contem elemento de resposta para o cAMP (Sitaraman *et al.*, 2001). Esses resultados sugerem que provavelmente aumento nos níveis intracelulares de cAMP, via receptores DAR I, nas células T induz a produção de IL-6 que, de maneira autócrina e parácrina, deve amplificar a produção de IL-17 e inibir a liberação de IL-10. Outra forma de favorecer a diferenciação das células T CD4<sup>+</sup> virgens em Th17 pode estar atrelada

aos efeitos imunomoduladores da DA sobre as células dendríticas (DCs). Estudo por Prado e colaboradores (2012) demonstrou que deficiência na expressão de receptores DAR I D5 nas DCs prejudicou a produção de IL-12 e IL-23 em resposta ao lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano. Interessantemente, a transferência dessas células reduziu a severidade da EAE, que foi acompanhando por uma redução expressiva na percentagem de células Th17 no infiltrado do SNC, sem diferença na frequência de células Th1 no parênquima cerebral. Ademais, a transferência de DCs pulsadas com peptídeo da proteína proteolípídica (PLP – *proteolipidic protein*), um dos antígenos alvo na resposta autoimune da EM, e tratadas com um antagonista de DAR I (SCH23390) preveniu o desenvolvimento da EAE (Nakano *et al.*, 2008). Esses resultados sugerem que a DA pode favorecer a diferenciação das células T CD4<sup>+</sup> em Th17 tanto diretamente quanto indiretamente, por aumentar a produção de IL-23 pelas DCs.

Além de favorecer diretamente a diferenciação das células T CD4<sup>+</sup> em Th17, a DA pode amplificar doenças inflamatórias imunomediadas por danificar a função das células T reguladoras (Tregs). Os linfócitos Tregs formam uma população relativamente heterogênea de células capazes de inibir respostas imunes mediadas por linfócitos T efetores pró-inflamatórios (Ohkura *et al.* 2013). Um dos mecanismos comuns utilizados por muitas dessas células para regular a inflamação é a produção de elevados níveis de citocinas anti-inflamatórias, particularmente a IL-10 e o TGF-β (Vignali, Collison & Workman, 2008). Em nosso modelo nenhuma diferença foi observada na produção dessas citocinas pelas culturas de células de ambos os grupos estudados. Interessantemente, a adição de DA foi capaz de diminuir, e forma significativa, a produção de IL-10 e TGF-β apenas nas culturas contendo células T policlionalmente ativadas de pacientes com EM-RR na fase de

remissão clínica. A dopamina, via DAR I, tem sido ligada à redução do tráfico e da função supressora das células Treg clássicas (CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup>) humanas (Cosentino *et al.*, 2007). Por outro lado, o uso de antagonista do receptor DAR I D1 elevou a produção de IL-10 por macrófagos murinos (Tarazona *et al.*, 1995). O único estudo publicado sobre o efeito da DA em pacientes com EM foi realizado por Cosentino e colaboradores (2012). Esses autores demonstraram que o tratamento de pacientes com EM-RR com IFN- $\beta$  por 12 meses reverteu a habilidade da DA em inibir a função supressora das células Tregs clássicas, apesar de nenhuma diferença ter sido observada no nível de expressão da proteína FoxP3 na fase pré e pós imunoterapia com a citocina. Esses resultados sugerem que antagonistas de DAR I podem ser usados como terapias adjuvantes no controle das doenças autoimunes, por duas diferentes vias, inibir células Th17 e aumentar a função supressora das células Tregs.

Enquanto novos fármacos têm sido usados em pacientes na remissão na tentativa de mudar o curso natural da doença, pulsoterapia com corticoide sintéticos é o tratamento eleito para controlar as recaídas clínicas. Em nosso estudo, maior resistência aos efeitos inibidores do glicocorticoide sobre a produção *in vitro* de IL-17 foi observada nas culturas de células contendo linfócitos T policlionalmente ativados, particularmente após a adição da DA.

Os glicocorticóides (GCs) endógenos, particularmente o cortisol, estão sob o controle do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e executam um papel importante em regular processos inflamatórios (Franchimont, 2004). Os GCs podem suprimir a produção de citocinas inflamatórias por inibirem a atividade do fator de transcrição nuclear chamado de fator nuclear da cadeia kappa da célula B (NF $\kappa$ B – *nuclear factor*  $\kappa$ B) (De Bosscher *et al.*, 2000). Elevada atividade do eixo HPA tem

sido observada em pacientes com EM e parece estar negativamente associado com o nível de inflamação aguda (Michelson *et al.*, 1994). Entretanto, apesar de GCs exógenos serem frequentemente utilizados no tratamento das recaídas clínicas dos pacientes com EM, a resposta a esses fármacos difere entre os pacientes, sugerindo diferenças na sensibilidade aos GCs (Gold *et al.*, 2012). Acredita-se que, após longos períodos de ativação elevada do eixo HPA, resistência central e periférica aos glicocorticoides surjam, primariamente devido a uma redução tanto na expressão quanto na sensibilidade dos receptores para os GC (Phillips *et al.*, 1998). Essa resistência ao GC compromete a regulação das respostas inflamatórias pelo eixo HPA, levando a um estado basal de elevada ativação imune (De Kloet *et al.*, 2007; Gotovac *et al.*, 2003). Nesse sentido, estudo por Roel e colaboradores (2004) demonstrou que concentrações superiores de dexametasona foram necessárias para reduzir em 50% os níveis de IL-6 produzidos por CMSP de pacientes com EM ativadas com LPS quando comparado ao grupo controle, isto é, indivíduos saudáveis. O mesmo fenômeno foi observado com relação à eficiência do GC em inibir a produção de TNF- $\alpha$  em culturas de monócitos de pacientes com EM-RR ativados com LPS (van Winsen *et al.*, 2005). Nesse último estudo, essa maior resistência ao GC não foi corrigida após uso de imunoterapia com IFN- $\beta$ . Finalmente, trabalho por Correale e colaboradores (2000) demonstrou que clones de células T específicas para o antígeno PLP de pacientes com EM com a forma progressiva secundária são mais resistentes à apoptose *in vitro* por GC. Coletivamente, esses resultados denunciam a existência de resistência periférica e central ao GC como mais um fator de risco para a progressão da doença e menor eficácia terapêutica com metilprednisona, um glicocorticoide sintético utilizado no controle das crises clínicas de déficit neurológico. Sabendo que nos pacientes com

EM em surto, pulsoterapia com corticoides é utilizado para ajudar no controle dos surtos (revisto por Lana-Peixoto *et al.*, 2002), esse resultado é muito interessante e pode ter implicações diretas sobre o impacto da DA em reduzir a eficácia terapêutica durante as crises clínicas, que é um fator de estresse para o paciente.

Em conjunto, os nossos resultados revelam uma maior tendência dos pacientes com esclerose múltipla com a forma recorrente remitente, em montar uma resposta majoritariamente relacionada ao fenótipo Th17, que é amplificado pela adição de dopamina e dependente de IL-6. Ademais, os efeitos adversos dessa catecolamina em amplificar esse fenótipo podem também estar relacionados à sua capacidade em reduzir a produção de citocinas anti-inflamatórias, importante na manutenção da homeostase imune. Nosso próximo objetivo será avaliar, através da citometria de fluxo, a capacidade da dopamina em modular a resposta das células T a antígenos da bainha de mielina.

## VI- CONCLUSÕES

- Foi observada uma maior linfoproliferação nas células dos indivíduos do grupo controle, quando comparado ao grupo de pacientes com EM-RR. Enquanto a DA diminuiu a proliferação *in vitro* das células T em resposta à PHA em indivíduos do grupo controle, essa catecolamina elevou a expansão policlonal nos pacientes com EM-RR.
- Nenhuma diferença significativa foi observada na produção *in vitro* de citocinas relacionadas ao fenótipo Th1 (IL-2 e IFN- $\gamma$ ) entre os grupos estudados. Porém, enquanto a adição de DA reduziu a secreção de IL-2 e IFN- $\gamma$  nas culturas de células de indivíduos controle, a liberação de IFN- $\gamma$  foi aumentada nas culturas de células de pacientes com EM-RR presença de DA.
- Em relação às citocinas do fenótipo Th2, não houve diferença entre os indivíduos saudáveis e os pacientes, nem com a estimulação pela PHA e DA.
- Com respeito às citocinas relacionadas e específicas do fenótipo Th17, níveis significativamente mais elevados de IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-17 foram dosados nos sobrenadantes das culturas de células de pacientes com EM-RR. Ademais, a adição de DA a essas culturas elevou a produção não apenas de IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-17, como também de IL-21.
- Foi estabelecida uma correlação positiva entre os níveis de IL-6 e IL-17, secretados pelas culturas de células dos pacientes com EM-RR, com o grau de incapacidade neurológica.
- Apesar de nenhuma diferença ter sido observada quanto aos níveis de IL-10 e TGF- $\beta$  produzidos entre ambos os grupos de indivíduos estudados, a adição de DA diminuiu a secreção destas citocinas apenas nas culturas obtidas dos pacientes com EM-RR.
- Interessantemente, o glicocorticoide hidrocortisona foi menos eficiente em inibir a produção de IL-17 em culturas de CMSP dos pacientes com EM-RR estimuladas com PHA, principalmente após a adição de DA.

- Quando as CMSP foram depletadas de diferentes populações de células T e estimuladas com PHA, houve uma diminuição significativa na secreção de IL-6 e IL-17 seguindo a depleção das células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>. No entanto, essa diferença foi maior quando houve a depleção das células T CD4<sup>+</sup>.
- O bloqueio da sinalização pelo receptor para IL-6 diminuiu a secreção de IL-17 na ausência de DA. Quando essa catecolamina foi adicionada às culturas, não só uma diminuição na secreção de IL-17 foi observada, mas um aumento na secreção de IL-10 nas culturas de células de pacientes com EM-RR.
- Nossos dados mostram que há uma forte tendência das células T dos pacientes com EM-RR em desenvolver uma resposta do tipo Th17, fato que é amplificado pela adição de DA. Ademais, a presença dessa catecolamina aumentou a resistência dessas células à inibição *in vitro* pelo glicocorticoide.

## VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, R. D.; Victor, M. (1989). Multiple sclerosis and allied demyelinating diseases. In: Principles of Neurology. 4a ed. New York, McGraw-Hill international editions, p. 755-774.

Agarwal, S. K.; Marshall, G. D. (1998). Glucocorticoid-induced type 1/type 2 cytokine alterations in humans: a model for stress-related immune dysfunction. *J. Interferon Cytokine Res.*, 18: 1059– 1068.

Alcina, A.; Fedetz, M.; Ndagire, D.; Fernández, O.; Leyva, L.; Guerrero, M.; Abad-Grau, M. M.; Arnal, C.; Delgado, C.; Lucas, M.; Izquierdo, G.; Matesanz, F. (2009). IL2RA/CD25 Gene Polymorphisms: Uneven Association with Multiple Sclerosis (MS) and Type 1 Diabetes (T1D). *PLoS ONE*, 4: e4137.

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

Aluvihare, V. R.; Kallikourdis, M.; Betz, A. G. (2004). Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat. Immunol.*, 5: 266–271.

Anderson, D. W.; Ellenberg, J. H.; Leventhal, C. M.; Reingold, S. C.; Rodriguez, M.; Silberberg, D. H. (1992). Revised estimate of the prevalence of multiple sclerosis in the United States. *Ann. Neurol.*, 31: 333-6.

Ando D. G.; Clayton J.; Kono D.; Urban, J. L.; Sercarz, E. E. (1989). Encephalitogenic T cells in the B10.PL model of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) are of the Th-1 lymphokine subtype. *Cell. Immunol.*, 124: 132–143.

Andrés, C.; Aristimuño, C.; de las Heras, V.; Martínez-Ginés, M. L.; Bartolomé, M.; Arroyo, R.; Navarro, J.; Giménez-Roldán, S.; Fernández-Cruz, E.; Sánchez-Ramón, S. (2007). Interferon beta-1a therapy enhances CD4+ regulatory T-cell function: An ex vivo and in vitro longitudinal study in relapsing–remitting multiplesclerosis. *J. Neuroimmunol.*, 182: 204–211.

Ascherio, A.; Mette, M. (2000). Epstein-Barr Virus and Multiple Sclerosis. *Epidemiol.*, 11: 220-224.

Ascherio, A.; Munger, K.L. (2007). Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: The role of infection. *Ann. Neurol.*, 61: 288–299.

Bakshi, R.; Shaikh, Z. A.; Miletich, R. S.; Czarnecki, D.; Dmochowski, J.; Henschel, K.; Janardhan, V.; Dubey, N.; Kinkel, P. R. (2000). Fatigue in multiple

sclerosis and its relationship to depression and neurologic disability. *Multiple Sclerosis*, 6: 181-185.

Barnes, M. S.; Bonham, M. P.; Robson, P. J.; Strain, J. J.; Lowe-Strong, A. S.; Eaton-Evans, J.; Ginty, F.; Wallace, J. M. W. (2007). Assessment of 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D3 concentrations in male and female multiple sclerosis patients and control volunteers. *Mult Scler.*, 13: 670-2.

Barrat, F. J.; Cua; D. J.; Bronstra, A. (2002). In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)-and Th2-inducing cytokines. *J. Exp. Med.*, 195: 603–616.

Basu, S.; Dasgupta, P. S. (2000). Dopamine, a neurotransmitter, influences the immune system. *J. Neuroimmunol.*, 102: 113–124.

Becher, B.; Durell, B. G.; Noelle, R. J. (2002). Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukin-12. *J. Clin. Invest.*, 110: 493–97.

Beiske, A. G.; Svensson, E.; Sandanger, I; Czujko, B; Pedersen, E. D.; Aarseth, J. H.; Myhr, K. M. (2008). Depression and anxiety amongst multiple sclerosis patients. *Eur J Neurol.*; 15: 239-45.

Ben-Jonathan; N.; Hnasko, R. (2001). Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr. Rev.*, 22: 724–763.

Bergquist, J.; Tarkowski, A.; Ekman, R.; Ewing, A. (1994). Discovery of endogenous catecholamines in lymphocytes and evidence for catecholamine regulation of lymphocyte function via an autocrine loop. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 12912–12916.

Bergquist, J.; Josefsson, E.; Tarkowski, A.; Ekman, R.; Ewing, A. (1997). Measurements of catecholamine-mediated apoptosis of immunocompetent cells by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 18: 1760–1766.

Birtwistle, J.; Baldwin, D. (1998). Role of dopamine in schizophrenia and Parkinson's disease. *Br. J. Nurs.*, 7: 832–834.

Bjartmar, C.; Wujek, J. R.; Trapp, B. D. (2003). Axonal loss in the pathology of MS: consequences for understanding the progressive phase of the disease. *J. Neurol. Sci.*, 206: 165–171.

Brucklacher-Waldert, V.; Sturner, K.; Kolster, M.; Wolthausen, J.; Tolosa, E. (2009). Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. *Brain*, 132: 3329–3341.

Callegaro, D.; Goldbaum, M.; Morais, L. (2001). The prevalence of multiple sclerosis in the city of Sao Paulo, Brazil, 1997. *Acta Neurol Scand.*, 104: 208-213.

Camporeale, A.; Poli, V. (2012). IL-6, IL-17 and STAT3: a holy trinity in auto-immunity? *Front Biosci.*, 17: 2306-26.

Carpentier, M.; Chappert, P.; Kuhn, C.; Lalfer, M.; Flament, H.; Burlen-Defranoux, O.; Lantz, O.; Bandeira, A.; Malissen, B.; Davoust, J.; Gross, D. A. (2013). Extrathymic induction of Foxp3+ regulatory T cells declines with age in a T-cell intrinsic manner. *Eur J Immunol*, doi: 10.1002/eji.201343532.

Cenci, M. A. (2007). L-DOPA-induced dyskinesia: cellular mechanisms and approaches to treatment. *Parkinsonism Relat. Disord.*, 13: S263-7

Cepok, S.; Zhou, D.; Srivastava, R.; Nessler, S.; Stei, S.; Büssow, K.; Sommer, N.; Hemmer, B. (2005). Identification of Epstein-Barr virus proteins as putative targets of the immune response in multiple sclerosis. *J Clin Invest.*, 115: 1352–1360.

Chu, C. Q.; Wittmer, S.; Dalton, D. K. (2000). 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.*, 192: 123–128.

Coquerelle, C.; Moser, M. (2010). DC subsets in positive and negative regulation of immunity. *Immunol. Rev.*, 234: 317-324.

Correale, J.; Gilmore, W.; Li, S.; Walsh, J.; Bassani, M. M.; Lund, B.; Arias, M.; Weiner, L. P. (2000). Resistance to glucocorticoid-induced apoptosis in PLP peptide-specific T cell clones from patients with progressive MS. *J Neuroimmunol.*, 109:197-210.

Correale, J.; Ysrraelit, M. C.; Gaitán, M. I. (2009). Immunomodulatory effects of Vitamin D in multiple sclerosis. *Brain*: 132: 1146–1160.

Cosentino, M.; Bombelli, R.; Ferrari, M.; Marino, F.; Rasini, E.; Maestroni, G. J.; Conti, A.; Boveri, M.; Lecchini, S.; Frigo, G. (2000). HPLC-ED measurement of endogenous catecholamines in human immune cells and hematopoietic cell lines. *Life Sci.*, 68: 283-295.

Cosentino, M.; Rasini, E.; Colombo, C.; Marino, F.; Blandini, F.; Ferrari, M.; Samuele, A.; Lecchini, S.; Nappi, G.; Frigo, G. (2004). Dopaminergic modulation of oxidative stress and apoptosis in human peripheral blood lymphocytes: evidence for a D1-like receptor-dependent protective effect. *Free Radic Biol Med.*, 36: 1233-40.

Cosentino, M.; Fietta, A. M.; Ferrari, M.; Rasini, E.; Bombelli, R.; Carcano, E.; Saporiti, F.; Meloni, F.; Marino, F.; Lecchini, S. (2007). Human CD4+CD25+

regulatory T cells selectively express tyrosine hydroxylase and contain endogenous catecholamines subserving an autocrine/paracrine loop. *Blood*, 109: 632-642.

Cosentino, M.; Zaffaroni, M.; Trojano, M.; Giorelli, M.; Pica, C.; Rasini, E.; Bombelli, R.; Ferrari, M.; Ghezzi, A.; Comi, G.; Livrea, P.; Lecchini, S.; Marino, F. (2012). Dopaminergic modulation of CD4+CD25(high) regulatory T lymphocytes in multiple sclerosis patients during interferon- $\beta$  therapy. *Neuroimmunomodulation*, 19: 283-92.

Costantino, C. M.; Baecher-Allan, C. M.; Hafler, D. A. (2008). Human regulatory T cells and autoimmunity. *Eur. J. Immunol.*, 38: 921–924.

Cua, D. J.; Sherlock, J.; Chen, Y.; Murphy, C. A.; Joyce, B.; Seymour, B.; Lucian, L.; To, W.; Kwan, S.; Churakova, T.; Zurawski, S.; Wiekowski, M.; Lira, S. A.; Gorman, D.; Kastelein, R. A.; Sedgwick, J. D. (2003). Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*, 421: 744–748.

Cuche, J. L.; Brochier, P.; Kliona, N.; Poirier, M.L. (1990). Conjugated catecholamines in human plasma: where they are coming from? *J. Lab. Clin. Med.*, 116: 681-686.

Dayan, P. (2009). Dopamine, reinforcement learning, and addiction. *Pharmacopsychiatry*, 42: S56–S65.

De Bosscher, K.; Vanden-Berghe, W.; Vermeulen, L.; Plaisance, S.; Boon, E.; Haegeman, G. (2000) Glucocorticoids repress NF-kappaB driven genes by disturbing the interaction of p65 with the basal transcription machinery, irrespective of coactivator levels in the cell. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97: 3919–3924.

De Kloet, C. S.; Vermetten, E.; Bikker, A.; Meulman, E.; Geuze, E.; Kavelaars, A.; Westenberg, H. G.; Heijnen, C. J. (2007) Leukocyte glucocorticoid receptor expression and immunoregulation in veterans with and without post-traumatic stress disorder. *Mol. Psych.*, 12: 443-453.

Dieckmann, D.; Plottner, H.; Berchtold, S.; Berger, T.; Schuler, G. (2001). Ex vivo isolation and characterization of CD4(+) CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J. Exp. Med.*, 193: 1303–1310.

Durelli, L.; Conti, L.; Clerico, M.; Boselli, D.; Contessa, G.; Ripellino, P.; Ferrero, B.; Eid, P.; Novelli, F. (2009). T-helper 17 cells expand in multiple sclerosis and are inhibited by interferon-beta. *Ann. Neurol.*, 65: 499–509.

Ekkens, M. J.; Liu, Z.; Liu, Q.; Whitmire, J.; Xiao, S.; Foster, A.; Pesce, J.; Vannoy, J.; Sharpe, A. H.; Urban, J. F.; Gause, W. C. (2003). The role of OX40 ligand

interactions in the development of the Th2 response to the gastrointestinal nematode parasite *Heligmosomoides polygyrus*. *J Immunol.*, 170: 384-93.

Esiri, M. M. (1977). Immunoglobulin-containing cells in multiple-sclerosis plaques. *Lancet*, 2: 478.

Esposito, P.; Chandler, N.; Kandere, K.; Basu, S.; Jacobson, S.; Connolly, R.; Tutor, D.; Theoharides, T. C. (2002). Corticotropin-releasing hormone and brain mast cells regulate blood-brain-barrier permeability induced by acute stress. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 303: 1061–1066.

Falcon, S. (2009). Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat. Rev. Immunol.*, 9: 407.

Fallarino, F.; Grohmann, U.; Hwang K.W.; Orabona, C.; Vacca, C.; Bianchi, R.; Belladonna, M. L.; Fioretti, M. C.; Alegre, M. L.; Puccetti, P. (2003). Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat. Immunol.*, 4: 1206–1212.

Fantini, M. C.; Becker, C.; Monteleone, G.; Pallone, F.; Galle, P. R.; Neurath, M. F. (2004). Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J. Immunol.*, 172: 5149–5153.

Feinstein, A. (2011). Multiple sclerosis and depression. *Multiple Sclerosis Journal*, 17: 1276–1281.

Ferber, I. A.; Brock, S.; Taylor-Edwards, C.; Ridgway, W.; Dinisco, C.; Steinman, L.; Dalton, D.; Fathman, C. G. (1996). Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J. Immunol.*, 156: 5–7.

Ferrari, M.; Cosentino, M.; Marino, F.; Bombelli, R.; Rasini, E.; Lecchini, S.; Frigo, G. (2004). Dopaminergic D1-like receptor-dependent inhibition of tyrosine hydroxylase mRNA expression and catecholamine production in human lymphocytes. *Biochem. Pharmacol.*, 67: 865–873.

Ferreira, T. B.; Kasahara, T. M.; Barros, P. O.; Vieira, M. M.; Bittencourt, V. C.; Hygino, J.; Andrade, R. M.; Linhares, U. C.; Andrade, A. F.; Bento, C. A. (2011). Dopamine up-regulates Th17 phenotype from individuals with generalized anxiety disorder. *J Neuroimmunol.*, 238: 58-66.

Fiszer, U. (2001). Does Parkinson's disease have an immunological basis? The evidence and its therapeutic implications. *BioDrugs*, 15: 351– 355.

Fragoso, Y.D.; Peres, M. (2007). Prevalence of multiple sclerosis in the city of Santos, São Paulo. *Rev. Bras. Epidemiol.*, 10: 479-482.

Franchimont, D. (2004). Overview of the actions of glucocorticoids on the immune response: a good model to characterize new pathways of immunosuppression for new treatment strategies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1024: 124-37.

Gan, X.; Zhang, L.; Newton, T.; Chang, S. L.; Ling, W.; Kermani, V.; Berger, O.; Graves, M. C.; Fiala, M. (1998). Cocaine infusion increases interferon-gamma and decreases interleukin-10 in cocaine-dependent subjects. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 89: 181–190.

Genain, C. P.; Cannella, B.; Hauser, S. L.; Raine, C. S. (1999). Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. *Nat. Med.*, 5: 170–75.

Ghosh, M. C.; Mondal, A. C.; Basu, S.; Banerjee, S.; Majumder, J.; Bhattacharya, D.; Dasgupta, P. S. (2003). Dopamine inhibits cytokine release and expression of tyrosine kinases, Lck and Fyn in activated T cells. *Int. Immunopharmacol.*, 3: 1019–1026.

Gold, S. M.; Sasidhar, M. V.; Lagishetty, V.; Spence, R. D.; Umeda, E.; Ziehn, M. O.; Krieger, T.; Schulz, K. H.; Heesen, C.; Hewison, M.; Voskuhl, R. R. (2012) Dynamic development of glucocorticoid resistance during autoimmune neuroinflammation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 97: E1402-10.

Gotovac, K.; Sabioncello, A.; Rabatic, S.; Berki, T.; Dejaris, D. (2003). Flow cytometric determination of glucocorticoid receptor (GCR) expression in lymphocyte subpopulations: Lower quantity of GCR in individuals with post-traumatic stress disorder (PTSD). *Clin. Exp. Immunol.*, 131: 335–339.

Gran, B.; Zhang, G. X.; Yu, S.; Li, J.; Chen, X. H.; Ventura, E. S.; Kamoun, M.; Rostami, A. (2002). IL-12p35-deficient mice are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis:evidence for redundancy in the IL-12 system in the induction of central nervous system autoimmune demyelination. *J. Immunol.*, 169: 7104–7110.

Grohmann, U.; Orabona, C.; Fallarino, F.; Vacca, C.; Calcinaro, F.; Falorni, A.; Candeloro, P.; Belladonna, M. L.; Bianchi, R.; Fioretti, M. C.; Puccetti, P. (2002). CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat. Immunol.*, 3: 1097–1101.

Groux, H.; O'Garra, A.; Bigler, M., Rouleau, M.; Antonenko, S.; de Vries, J. E.; Roncarolo, M. G. (1997). A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*, 389: 737–742.

Groux, H. (2003). Type 1 T-regulatory cells: their role in the control of immune responses. *Transplantation*, 75: 8S-12S.

- Gutcher, I.; Becher, B. (2007). APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation. *J. Clin. Invest.*, 117: 1119-27.
- Haase, C. G.; Faustmann, P. M. (2004). Benign multiple sclerosis is characterized by a stable neuroimmunologic network. *Neuroimmunomodulation*, 11: 273-7.
- Haegert, D. G.; Swift, F. V.; Benedikz, J. (1996). Evidence for a complex role of HLA class II genotypes in susceptibility to multiple sclerosis in Iceland. *Neurology*, 46: 1107-1111.
- Hall, B. M.; Verma, N. D.; Tran, G. T.; Hodgkinson, S. J. (2011). Distinct regulatory CD4+T cell subsets; differences between naïve and antigen specific T regulatory cells. *Curr. Opin. Immunol.*, 23: 641-647.
- Hashimoto, K.; Inoue, T.; Higashi, T.; Takei, S.; Awata, T.; Katayama, S.; Takagi, R.; Okada, H.; Matsushita S. (2009). Dopamine D1-like receptor antagonist, SCH23390, exhibits a preventive effect on diabetes mellitus that occurs naturally in NOD mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 383: 460–463.
- Hirtz, D.; Thurman, D. J.; Gwinn-Hardy, K.; Mohamed, M.; Chaudhuri, A. R.; Zalutsky, R. (2007). How common are the "common" neurologic disorders? *Neurology*, 68: 326-37.
- Hisanaga, K.; Asagi, M.; Itoyama, Y.; Iwasaki, Y. (2001). Increase in peripheral CD4 bright+ CD8 dull+T cells in Parkinson disease. *Arch. Neurol.*, 58: 1580–1583.
- Iagmurov, O. D.; Ogurtsov, R. P. (1996). Functional activity of spleen and peripheral lymphocytes during stress-induced immunodepression. *Biull. Eksp. Biol. Med.*, 122: 64-68,.
- Ilani, T.; Ben-Shachar, D.; Strous, R. D.; Mazor, M.; Sheinkman, A.; Kotler, M.; Fuchs, S. (2001). A peripheral marker for schizophrenia: Increased levels of D3 dopamine receptor mRNA in blood lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98: 625– 628.
- Madara, J. L. (2001). Neutrophil-epithelial crosstalk at the intestinal luminal surface mediated by reciprocal secretion of adenosine and IL-6. *J. Clin. Invest.*, 107: 861–869.
- Jafari, M.; Ahangari, G.; Saberi, M.; Samangoui, S.; Torabi, R.; Zouali, M. (2013). Distorted expression of dopamine receptor genes in systemic lupus erythematosus. *Immunobiology*, 218: 979-83.
- Jagannath, V. A.; Fedorowicz, Z.; Asokan, G. V. (2010). Vitamin D for the management of Multiple Sclerosis. *Cochrane Database Sys. Rev.*, 12: CD008422.

Josefsson, E.; Bergquist, J.; Ekman, R.; Tarkowski, A. (1996). Catecholamines are synthesized by mouse lymphocytes and regulate function of these cells by induction of apoptosis. *Immunology*, 88: 140–146.

Jovanovic, D. V.; Di Battista, J. A.; Martel-Pelletier, J.; Jolicoeur, F. C.; He, Y.; Zhang, M.; Mineau, F.; Pelletier, J. P. (1998). IL-17 stimulates the production and expression of pro-inflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J Immunol.*, 160: 3513-21.

Kebir, H.; Kreymborg, K.; Ifergan, I.; Dodelet-Devillers, A.; Cayrol, R.; Bernard, M.; Giuliani, F.; Arbour, N.; Becher, B.; Prat, A. (2007). Human Th17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat. Med.*, 13: 1173-1175.

Kebir, H.; Ifergan, I.; Alvarez, J. I.; Bernard, M.; Poirier, J.; Arbour, N.; Duquette, P.; Prat, A. (2009). Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.*, 66: 390–402.

Kipnis, J.; Cardon, M.; Avidan, H.; Lewitus, G. M.; Mordechay, S.; Rolls, A.; Shani, Y.; Schwartz, M. (2004). Dopamine, through the extracellular signal-regulated kinase pathway, downregulates CD4+CD25+ regulatory T-cell activity: implications for neurodegeneration. *J. Neurosci.*, 24: 6133–6143.

Kirillova, G. P.; Hrutkay, R. J.; Shurin, M. R.; Shurin, G. V.; Tourkova, I. L.; Vanyukov, M. M. (2008). Dopamine receptors in human lymphocytes: radioligand binding and quantitative RT PCR assays. *J. Neurosci. Methods*, 174: 272–280.

Kurtzke, J. F. (1983). Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*, 33: 1444–1452.

La Via, M. F.; Munno, I.; Lydiard, R. B.; Workman, E. W.; Hubbard, J. R.; Michel, Y.; Paulling, E. (1996). The influence of stress intrusion on immunodepression in generalized anxiety disorder patients and controls. *Psychosom. Med.*, 58: 138-142.

Lana-Peixoto, M. A.; Callegaro, D.; Moreira, M. A.; Campos, G. B.; Marchiori, P. E.; Gabbai, A. A.; Bacheschi, L. A.; Arruda, W. O.; Gama, P. D.; Melo, A. S.; Rocha, F. C. G.; Lino, A. M. M.; Ferreira, M. L. B.; Ataíde Júnior, L.; demais participantes da Reunião do Consenso sobre Tratamento da Esclerose Múltipla do Comitê Brasileiro de Tratamento e Pesquisa em Esclerose Múltipla (BCTRIMS). (2002). Consenso expandido do BCTRIMS para o tratamento da esclerose múltipla. III. Diretrizes baseadas em evidências e recomendações. *Arq. Neuropsiquiatr.*, 60: 881-886.

Langrish, C. L.; Chen, Y.; Blumenschein, W. M.; Mattson, J.; Basham, B.; Sedgwick, J. D.; McClanahan, T.; Kastelein, R. A.; Cua, D. J. (2005). IL-23 drives

a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.*, 201: 233–240.

LeBlanc, J.; Ducharme, M. B. (2007). Plasma dopamine and noradrenaline variations in response to stress. *Psychol. Behav.*, 91: 208-211.

Lee, C. C.; Lin, S. J.; Cheng, P. L.; Kuo, M. L. (2009). The regulatory function of umbilical cord blood CD4(+) CD25(+) T cell stimulated with anti-CD3/anti-CD28 and exogenous IL-2 or IL-15. *Pediatric Allergy Immunol.*, 20: 624-63.

Levings M. K.; Sangregorio, R.; Roncarolo, M. G. (2001). Human CD25(+) CD4(+) T regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J. Exp. Med.*, 193: 1295–1302.

Levings, M. K.; Sangregorio, R.; Sartirana, C. (2002). Human CD25+CD4+ T suppressor cell clones produce transforming growth factor beta, but not interleukin 10, and are distinct from type 1 T regulatory cells. *J Exp Med.*, 196: 1335–46.

Liu, W.; Putnam, A. L.; Xu-Yu, Z.; Szot, G. L.; Lee, M. R.; Zhu, S.; Gottlieb, P. A.; Kapranov, P.; Gingeras, T. R.; Fazekas de St Groth, B.; Clayberger, C.; Soper, D. M.; Ziegler, S. F.; Bluestone, J. A. (2006). CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J. Exp. Med.*, 203: 1701-1711.

Liu, X.; Lee, Y. S.; Yu, C. R.; Egwuagu, C. E. (2008). Loss of STAT3 in CD4+ T cells prevents development of experimental autoimmune diseases. *J. Immunol.*, 180: 6070–6076.

Lock, C.; Hermans, G.; Pedotti, R.; Brendolan, A.; Schadt, E.; Garren, H.; Langer-Gould, A.; Strober, S.; Cannella, B.; Allard, J.; Klonowski, P.; Austin, A.; Lad, N.; Kaminski, N.; Galli, S. J.; Oksenberg, J. R.; Raine, C. S.; Heller, R.; Steinman, L. (2002). Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis, *Nat. Med.*, 8: 500–508.

Lovett-Racke, A. E.; Yang, Y.; Racke, M. K. (2011). Th1 versus Th17: Are T cell cytokines relevant in multiple sclerosis? *Bioch. Bioph. Acta.*, 1812: 246–251.

Lublin, F. D.; Knobler, R. L.; Kalman, B.; Goldhaber, M.; Marini, J.; Perrault, M.; D'Imperio, C.; Joseph, J.; Alkan, S. S.; Korngold, R. (1993). Monoclonal anti-gamma interferon antibodies enhance experimental allergic encephalomyelitis. *Autoimmunity*, 16: 267–274.

Lucchinetti, C.; Brück, W.; Parisi, J.; Scheithauer, B.; Rodriguez, M.; Lassmann, H. (2000). Heterogeneity of Multiple Sclerosis Lesions: Implications for the Pathogenesis of Demyelination. *Ann. Neurol.*, 47: 707–717.

- Ma, A.; Xiong, Z.; Hu, Y.; Qi, S.; Song, L.; Dun, H.; Zhang, L.; Lou, D.; Yang, P.; Zhao, Z.; Wang, X.; Zhang, D.; Daloz, P.; Chen, H. (2009). Dysfunction of IL-10-producing type 1 regulatory T cells and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in a mimic model of human multiple sclerosis in *Cynomolgus* monkeys. *Intern. Immunopharmacol.*, 9: 599-608.
- Maestroni, G. J.; Mazzola, P. (2003). Langerhans cells beta 2-adrenoceptors: role in migration, cytokine production, Th priming and contact hypersensitivity. *J. Neuroimmunol.*, 144: 91–99.
- Mahnke, K.; Enk, A. H. (2005). Dendritic cells: key cells for the induction of regulatory T cells? *Cur. Topics Microbiol. Immunol.*, 293: 133–150.
- Matsuzaki, G.; Umemura, M. (2007). IL-17 as an effector molecule of innate and acquired immunity against infections. *Microbiol. Immunol.*, 51: 1139-1147.
- Mattson, D. H.; Roos, R. P.; Arnason, B. G. (1980). Isoelectric focusing of IgG eluted from multiple sclerosis and subacute sclerosing panencephalitis brains. *Nature*, 287: 335–37.
- Matusevicius, D.; Kivisakk, P.; He, B.; Kostulas, N.; Ozenci, V.; Fredrikson, S.; Link, H. (1999). Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult. Scler.*, 5: 101–104.
- McFarlin, D. E.; McFarland, H. F. (1982). Multiple sclerosis (first of two parts). *N. Engl. J. Med.*, 307: 1183-8.
- McFarlin, D. E.; McFarland, H. F. (1982). Multiple sclerosis (second of two parts). *N. Engl. J. Med.*, 307: 1246-51.
- McKenna, F.; Mclaughlin, P. J.; Lewis, B. J.; Sibbring, G. C.; Cummerson, J. A.; Bowen-Jones, D.; Moots, R. J. (2002). Dopamine receptor expression on human T- and B-lymphocytes, monocytes, neutrophils, eosinophils and NK cells: a flow cytometric study. *J. Neuroimmunol.*, 132: 34–40.
- McKinstry, K. K.; Strutt, T. M.; Swain, S. L. (2010). The potential of CD4 T-cell memory *Immunology* 130: 1-9.
- Michel, L.; Berthelot, L.; Pettré, S.; Wiertlewski, S.; Lefrère, F.; Braudeau, C.; Brouard, S.; Souillou, J. P.; Laplaud, D. A. (2008). Patients with relapsing-remitting multiple sclerosis have normal Treg function when cells expressing IL receptor  $\alpha$ -chain are excluded from the analysis. *J. Clin. Invest.*, 118: 3411-3419.
- Michelson, D.; Stone, L.; Galliven, E.; Magiakou, M. A.; Chrousos, G. C.; Sternberg, E. M.; Gold, P. W. (1994). Multiple sclerosis is associated with alterations in hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. *J Clin Endocrinol Metab.*, 79: 848-853.

- Mignini, F.; Streccioni, V.; Amenta, F. (2003). Autonomic innervation of immune organs and neuroimmune modulation. *Auton. Autacoid Pharmacol.*, 23: 1–25.
- Mignini, F.; Traini, E.; Tomassoni, D.; Amenta, F. (2006). Dopamine plasma membrane transporter (DAT) in rat thymus and spleen: an immunohistochemical and immunohistochemical study. *Auton. Autacoid. Pharmacol.*, 26: 183-189.
- Mihara, M.; Kasutani, K.; Okazaki, M.; Nakamura, A.; Kawai, S.; Sugimoto, M.; Matsumoto, Y.; Ohsugi, Y. (2005). Tocilizumab inhibits signal transduction mediated by both mL-6R and sIL-6R, but not by the receptors of other members of IL-6 cytokine family. *International Immunopharmacology*, 5: 1731–1740.
- Mills, G. B.; Schmandt, R.; Gibson, S.; Leung, B.; Hill, M.; May, C.; Shi, Y. F.; Branch, D. R.; Radvanyi, L.; Truitt, K. E., Imboden, J. (1993). Transmembrane signaling by the interleukin-2 receptor: progress and conundrums. *Semin Immunol.*, 5: 345-64.
- Miossec, P. (2009). IL-17 and Th17 cells in human inflammatory diseases. *Microb. Infect.*, 11: 625-630.
- Missale, C.; Nash-Russel, S.; Robinson, S. W.; Jaber, M.; Caron, M. G. (1998). Dopamine receptors: from structure to function. *Phys. Rev.*, 78: 189-225.
- Mittleman, B. B.; Castellanos, F. X.; Jacobsen, L. K.; Rapoport, J. L.; Swedo, S. E.; Shearer, G. M. (1997). Cerebrospinal fluid cytokines in pediatric neuropsychiatric disease. *J. Immunol.*, 159: 2994– 2999.
- Muller, N.; Riedel, M.; Gruber, R.; Ackenheil, M.; Schwarz, M. J. (2000). The immune system and schizophrenia: An integrative view. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 917: 456–467.
- Munger, K. L.; Zhang, S. M.; O'Reilly, E.; Hernán, M. A.; Olek, M. J.; Willett, W. C.; Ascherio, A. (2004). Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. *Neurology*, 62: 60-65.
- Munger, K. L.; Levin, L. I.; Hollis, B. W. (2006). Serum 25-Hydroxyvitamin D Levels and Risk of Multiple Sclerosis. *JAMA*, 296: 2832-2838.
- Nagai, Y.; Ueno, S.; Saeki, Y.; Soga, F.; Hirano, M.; Yanagihara, T. (1996). Decrease of the D3 dopamine receptor mRNA expression in lymphocytes from patients with Parkinson's disease. *Neurology*, 46: 791–795.
- Nakamura, K.; Kitani, A.; Fuss, I.; Pedersen, A.; Harada, N.; Nawata, H.; Strober, W. (2004). TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice. *J. Immunol.*, 172: 834–842.

Nakano, K.; Higashi, T.; Hashimoto, K.; Takagi, R.; Tanaka, Y.; Matsushita, S. (2008). Antagonizing dopamine D1-like receptor inhibits Th17 cell differentiation: preventive and therapeutic effects on experimental autoimmune encephalomyelitis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 373: 286–291.

Nakano, K.; Higashi, T.; Takagi, R.; Hashimoto, K.; Tanaka, Y.; Matsushita, S. (2009a). Dopamine released by dendritic cells polarizes Th2 differentiation. *Int. Immunol.*, 21: 645–654.

Nakano, K.; Matsushita, S.; Saito, K.; Yamaoka, K.; Tanaka, Y. (2009b). Dopamine as a immune-modulator between dendritic cells and T cells and the role of dopamine in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*, 32: 1-6.

Nakano, K.; Yamaoka, K.; Hanami, K.; Saito, K.; Sasaguri, Y.; Yanagihara, N.; Tanaka, S.; Katsuki, I.; Matsushita, S.; Tanaka, Y. (2011). Dopamine Induces IL-6–Dependent IL-17 Production via D1-Like Receptor on CD4 Naive T Cells and D1-Like Receptor Antagonist SCH-23390 Inhibits Cartilage Destruction in a Human Rheumatoid Arthritis/SCID Mouse Chimera Model. *The Journal of Immunology*, 186: 3745–3752.

Nurieva, R.; Yang, X. O.; Martinez, G.; Zhang, Y.; Panopoulos, A. D.; Ma, L.; Schluns, K.; Tian, Q.; Watowich, S. S.; Jetten, A. M.; Dong, C. (2007). Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature*, 448: 480-483

Nature 448, 480-483 (26 July 2007) |

Obar, J. J.; Lefrançois, L. (2010). Memory CD8+ T cell differentiation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1183: 251-266.

Ohkura, N.; Kitagawa, Y.; Sakaguchi, S. (2013). Development and maintenance of regulatory T cells. *Immunity*, 38: 414-23.

Okada, H.; Inoue, T.; Hashimoto, K.; Suzuki, H.; Matsushita, S. (2009). D1-like receptor antagonist inhibits IL-17 expression and attenuates crescent formation in nephrotoxic serum nephritis. *Am. J. Nephrol.*, 30: 274–279.

Okuda, Y.; Sakoda, S.; Bernard, C. C.; Fujimura, H.; Saeki, Y.; Kishimoto, T.; Yanagihara, T. (1998). IL-6-deficient mice are resistant to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis provoked by myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Int. Immunol.* 10: 703–708.

Owens, T.; Tran, E.; Hassan-Zahraee, M.; Krakowski, M. (1998). Immune cell entry to the CNS – a focus for immunoregulation of EAE. *Res. Immunol.*, 149: 781-789.

- Pacheco, R.; Prado, C. E.; Barrientos, M. J.; Bernales, S. (2009). Role of dopamine in the physiology of T-cells and dendritic cells. *Journal of Neuroimmunology*, 216: 8-19.
- Penna, G.; Giarratana, N.; Amuchastegui, S.; Mariani, R.; Daniel, K. C.; Adorini, L. (2005). Manipulating dendritic cells to induce regulatory T cells. *Microb. Infec.*, 7: 1033–1039.
- Phillips, D. I. W.; Barker, D. J. P.; Fall, C. H. D.; Seckl, J. R.; Whorwood, C. B.; Wood, P. J.; Walker, B. R. (1998). Elevated Plasma Cortisol Concentrations: A Link between Low Birth Weight and the Insulin Resistance Syndrome? *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 83: 757-760.
- Piccirillo, C. A.; Shevach, E. M. (2001). Cutting edge: Control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *J. Immunol.*, 167: 1137–1140.
- Polanczyk, M. J.; Carson, B. D.; Subramanian, S.; Afentoulis, M.; Vandenberg, A. A.; Ziegler, S. F.; Offner, H. (2004). Cutting edge: estrogen drives expansion of the CD4+CD25+ regulatory T cell compartment. *J. Immunol.*, 173: 2227–2230.
- Polanczyk, M.; Hopke, C.; Vandenberg, A.; Offner, H. (2006). Estrogen mediated immunomodulation involves reduced activation of effector T cells, potentiation of Treg cells, and enhanced expression of the PD-1 costimulatory pathway. *J. Neurosci. Res.*, 284: 370–378.
- Poser, S.; Poser, W. (1983). Multiple sclerosis and gestation. *Neurol.*, 33: 1422-1427.
- Potvin, S.; Grignon, S.; Marchand, S. (2009). Human evidence of a supra-spinal modulating role of dopamine on pain perception. *Synapse*, 63: 390–402.
- Prado, C.; Contreras, F.; González, H.; Díaz, P.; Elgueta, D.; Barrientos, M.; Herrada, A. A.; Lladser, Á.; Bernales, S., Pacheco, R. (2012). Stimulation of dopamine receptor D5 expressed on dendritic cells potentiates Th17-mediated immunity. *J Immunol.*, 188: 3062-70.
- Rao, S. M.; Leo, G. J.; Bernardin, L.; Unverzagt, F. (1991). Cognitive dysfunction in multiple sclerosis. *Neurology*, 41: 685-691.
- Reboldi, A.; Coisne, C.; Baumjohann, D.; Benvenuto, F.; Bottinelli, D.; Lira, S.; Uccelli, A.; Lanzavecchia, A.; Engelhardt, B.; Sallusto, F. (2009). C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat Immunol.*, 10: 514-23.
- Roel, H. D.; Eskandari, F.; Stenberg, E. M. (2004). Corticosteroid resistance in a subpopulation of multiple sclerosis patients as measured by ex vivo

dexamethasone inhibition of LPS induced IL-6 production. *J. Neuroimmunol.*, 151: 180-188.

Roncarolo, M. G.; Bacchetta, R.; Bordignon, C.; Narula, S.; Levings, M. K. (2001). Type 1 T regulatory cells. *Immunol. Rev.*, 182: 68–79.

Runmarker, B.; Martinsson, T.; Wahlström, J.; Andersen O. (1994). HLA and prognosis in multiple sclerosis. *J. Neurol.*, 241: 385-390.

Sabban, E. L.; Kvetňanský, R. (2001). Stress-triggered activation of gene expression in catecholaminergic systems: dynamics of transcriptional events. *Trends in Neurosciences*, 24: 91-98.

Saha, B.; Mondal, A. C.; Basu, S.; Dasgupta, P. S. (2001a). Circulating dopamine level, in lung carcinoma patients, inhibits proliferation and cytotoxicity of CD4+ and CD8+ T cells by D1 dopamine receptors: an in vitro analysis. *Int. Immunopharmacol.*, 1: 1363–1374.

Saha, B.; Mondal, A. C.; Majumder, J.; Basu, S.; Dasgupta, P.S. (2001b). Physiological concentrations of dopamine inhibit the proliferation and cytotoxicity of human CD4+CD8+ T cells in vitro: a receptor-mediated mechanism. *Neuroimmunomodulation*, 9: 23–33.

Saito, S.; Shima A., Nakashima A.; Shiozaki, A.; Ito, M.; Sasaki, Y. (2007). What is the role of regulatory T cells in the success of implantation and early pregnancy? *J. Assist. Reprod. Gen.*, 24: 379–386.

Salah, R. S.; Kuhn, D. M.; Galloway, M. P. (1989). Dopamine autoreceptors modulate the phosphorylation of tyrosine hydroxylase in rat striatal slices. *J. Neurochem.*, 52: 1517–22.

Sarkar, C.; Basu, B.; Chakroborty, D.; Dasgupta, P. S.; Basu, S. (2010). The immunoregulatory role of dopamine: An update. *Brain, Behavior, and Immunity*, 24: 525–528.

Saule, P.; Trauet, J.; Dutriez, V.; Lekeux, V.; Dessaint J. P.; Labalette, M. (2006). Accumulation of memory T cells from childhood to old age: Central and effector memory cells in CD4+ versus effector memory and terminally differentiated memory cells in CD8+ compartment. *Mechanisms of Ageing and Development*, 127: 274–281.

Schumacher, G. A.; Kibler, B. G.; Kurland, L. T.; Kurland, L. T.; Kurtzke, J. F.; McDowell, F.; Nagler, B.; Sibley, W. A.; Tourtellotte, W. W.; Willmon, T. L. (1965). Problems of experimental trials of therapy in multiple sclerosis: report by the panel on evaluation of experimental trials of therapy in multiple sclerosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 122: 552-568.

- Selmi, C.; Leung, P. S. C.; Sherr, D. H.; Diaz, M.; Nyland, J. F.; Monestier, M.; Rose, N. R.; Gershwin, M. E. (2012). Mechanisms of environmental influence on human autoimmunity: A national institute of environmental health sciences expert panel workshop. *J Autoimmun.*, 39: 272-284.
- Shevach, E. M.; DiPaolo, R. A.; Andersson, J.; Zhao, D. M.; Stephens, G. L.; Thornton, A. M. (2006). The lifestyle of naturally occurring CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Immunol. Rev.*, 212: 60–73.
- Shibasaki, H.; McDonald W. I.; Kuroiwa, Y. (1981). Racial modification of clinical picture of multiple sclerosis: comparison between British and Japanese patients. *J. Neurol. Sci.*, 49: 253-271.
- Sidhu, A. (1998). Coupling of D1 and D5 dopamine receptors to multiple G proteins: implications for understanding the diversity in receptor-G protein coupling. *Mol. Neurobiol.*, 16: 125-134.
- Simpson, S.; Taylor, B.; Blizzard, L. (2010). Higher 25-hydroxyvitamin D is associated with lower relapse risk in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.*, 68: 193–203.
- Sitaraman, S. V.; Merlin, D.; Wang, L.; Wong, M.; Gewirtz, A. T.; Si-Tahar, M.; Madara, J. L. (2001). Neutrophil-epithelial crosstalk at the intestinal luminal surface mediated by reciprocal secretion of adenosine and IL-6. *J Clin Invest.*, 107: 861-9.
- Skurkovich, S.; Boiko, A.; Beliaeva, I.; Buglak, A.; Alekseeva, T.; Smirnova, N.; Kulakova, O.; Tchechonin, V.; Gurova, O.; Deomina, T.; Favorova, O. O.; Skurkovic, B.; Gusev, E. (2001). Randomized study of antibodies to IFN-gamma and TNFalpha in secondary progressive multiple sclerosis. *Mult. Scler.*, 7: 277–284.
- Smolders, J.; Thewissen, M.; Peelen, E.; Menheere, P.; Tervaert, J. W. C.; Damoiseaux, J.; Hupperts, R. (2009). Vitamin D status is positively correlated with regulatory T cell function in patients with multiple sclerosis. *PLOS ONE*, 4: e6635.
- Sospedra, M.; Martin, R. (2005). Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol.*, 23: 683-747.
- Spach, K. M.; Noubade, R.; McElvany, B.; Hickey, W. F.; Blankenhorn, E. P.; Teuscher, C. (2009). Nucleotide polymorphism in Tyk2 controls susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis. *J. Immunol.*, 182: 7776-7783.
- Steinbrink, K.; Jonuleit, H.; Müller, G.; Schuler, G.; Knop, J.; Enk, A. H. (1999). Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood*, 93: 1634–1642.

- Steinman, L. (2001). Multiple sclerosis: a two-stage disease. *Nat. Immunol.*, 2: 762–764.
- Stephens, L. A.; Mottet, C.; Mason, D.; Powrie, F. (2001). Human CD4 (+) CD25(+) thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity in vitro. *Eur. J. Immunol.*, 31: 1247–1254.
- Stojanovich, L.; Marisavljevich, D. (2008). Stress as a trigger of autoimmune disease. *Autoimmun Rev.*, 7: 209-13.
- Strange, P. G. (1993). New insights into dopamine receptors in the central nervous system. *Neurochem. Int.*, 22: 223–236.
- Strobl, H.; Knapp, W. (1999). TGF-beta1 regulation of dendritic cells. *Microbes Infect.*, 1:1283-90.
- Tai, P.; Wang, J.; Jin, H.; Song, X.; Yan, J.; Kang, Y.; Zhao, L.; An, X.; Du, X.; Chen, X.; Wang, S.; Xia, G.; Wang, B. (2008). Induction of regulatory T cells by physiological level estrogen. *J. Cell. Physiol.*, 214: 456-464.
- Tarazona, R.; Gonzalez-Garcia, A.; Zamzami, N.; Marchetti, P.; Frechin, N.; Gonzalo, J. A.; Ruiz-Gayo, M.; van Rooijen, N.; Martinez, C.; Kroemer, G. (1995). Chlorpromazine amplifies macrophage-dependent IL-10 production in vivo. *J. Immunol.*, 154: 861–870.
- Temlett, J. A. (1996). Parkinson's disease: biology and aetiology. *Curr. Opin. Neurol.*, 9: 303–307.
- van Winsen, L. M. L.; Muris, D. F. R.; Polman, C. H.; Dijkstra, C. D.; van den Berg, T. K.; Uitdehaag, B. M. J. (2005). Sensitivity to Glucocorticoids Is Decreased in Relapsing Remitting Multiple Sclerosis. *J Clinical Endocrinol Metab.*, 90: 734-740.
- Venken, K.; Hellings, N.; Thewissen, M.; Somers, V.; Hensen, K.; Rummens, J. L.; Medaer, R.; Hupperts, R.; Stinissen, P. (2007). Compromised CD4+ CD25high regulatory T-cell function in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is correlated with a reduced frequency of FOXP3-positive cells and reduced FOXP3 expression at the single-cell level. *Immunol.*, 123: 79–89.
- Venken, K.; Hellings, N.; Broekmans, T.; Hensen, K.; Rummens, J. L.; Stinissen, P. (2008). Natural Naive CD4+CD25+CD127low Regulatory T Cell (Treg) Development and Function Are Disturbed in Multiple Sclerosis Patients: Recovery of Memory Treg Homeostasis during Disease Progression. *J. Immunol.*, 180: 6411-6420.
- Vignali, D. A.; Collison, L. W.; Workman, C. J. (2008). How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.*, 8: 523–532.

- Walker, M. R.; Carson, B. D.; Nepom, G. T.; Ziegler, S. F.; Buckner, J. H. (2005). De novo generation of antigen-specific CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells from human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> cells. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 102: 4103-4108.
- Wandinger, K. P.; Hagenah, J. M.; Klüter, H.; Rothermundt, M.; Peters, M.; Vieregge, P. (1999). Effects of amantadine treatment on in vitro production of interleukin-2 in de-novo patients with idiopathic Parkinson's disease. *J. Neuroimmunol.*, 98: 214–220.
- Warren, S.; Greenhill, S.; Warren, K. G. (1982). Emotional stress and the development of multiple sclerosis: case-control evidence of a relationship. *J. Chronic Dis.*, 35: 821–831.
- Weber, M. S.; Hohlfeld, R.; Zamvi, S. S. (2007). Mechanism of Action of Glatiramer Acetate in Treatment of Multiple Sclerosis. *Neurotherapeutics*, 4: 647–653.
- Weihe, E.; Depboylu, C.; Schütz, B.; Schäfer, M. K.; Eiden, L. E. (2006). Three types of tyrosine hydroxylase-positive CNS neurons distinguished by dopa decarboxylase and VMAT2 co-expression. *Cell Mol. Neurobiol.*, 26: 659-78.
- Welsh, C. J.; Steelman, A. J.; Mi, W.; Young, C. R.; Storts, R.; Welsh, T. H. Jr.; Meagher, M. W. (2009). Neuroimmune Interactions in a Model of Multiple Sclerosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1153: 209-19.
- Wickens, J. R.; Arbuthnott, G. W. (2005). Structural and functional interactions in the striatum at the receptor level. In *Handbook of Chemical Neuroanatomy*. S. B. Dunnet, M. Bentivoglio, A. Bjorklund, and T. Hokfelt, eds. Elsevier Science Publishing Co., Amsterdam, p. 199–236
- Willenborg, D. O.; Fordham, S.; Bernard, C. C.; Cowden, W. B.; Ramshaw, I. A. (1996). IFN $\gamma$  plays a critical down-regulatory role in the induction and effector phase of myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis, *J. Immunol.*, 157: 3223–3227.
- Wing, K.; Ekmark, A.; Karlsson, H.; Rudin, A.; Suri-Payer, E. (2002). Characterization of human CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells in thymus, cord and adult blood. *Immunol.*, 106: 190–199.
- Wise, R. A. (2008). Dopamine and reward: the anhedonia hypothesis 30 years on. *Neurotox. Res.*, 14: 169–183.
- Wolburg, H.; Paulus, W. (2010). Choroid plexus: biology and pathology. *Acta Neuropathol.*, 119: 75-88.
- Wood, K. J.; Sakaguchi, S. (2003). Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat. Rev. Immunol.*, 3: 199–210.

Xu, L.; Kitani, A.; Strober, W. (2010). Molecular mechanisms regulating TGF-beta-induced Foxp3 expression. *Mucosal Immunol.*, 3: 230-238.

Yura, M.; Takahashi, I.; Serada, M.; Koshio, T.; Nakagami, K.; Yuki, Y.; Kiyono, H. (2001). Role of MOG-stimulated Th1 type "light up" (GFP+) CD4+ T cells for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), *J.Autoimmun.*, 17: 17–25.

Zaghouani, H.; Hoeman, C. M.; Adkins, B. (2009). Neonatal immunity: faulty T-helpers and the shortcomings of dendritic cells. *Trend. Immunol.*, 30: 585-591.

Zhou, L.; Ivanov, I. I.; Spolski, R.; Min, R.; Shenderov, K.; Egawa, T.; Levy, D. E.; Leonard, W. J.; Littman, D. R. (2007). IL-6 programs Th17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nature Immunology*, 8: 967 - 974

Zhu, J.; Yamane, H.; Paul, W. E. (2010). Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Ann. Rev. Immunol.*, 28: 445-489.

## VIII- ANEXOS



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

**Departamento de Microbiologia e Parasitologia**

**Laboratório de Imunofisiologia e Imunopatologia dos linfócitos T**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**Título do Projeto**

**“Avaliação fenotípica e funcional dos linfócitos T de pacientes com neuromielite óptica”**

**Título do SubProjeto:**

**“Avaliação fenotípica e funcional dos linfócitos T de pacientes com neuromielite óptica: comparação com a esclerose múltipla”**

Investigador Principal: Dra. Cleonice Alves de Melo Bento – Professora de Imunologia da UNIRIO.

Tels.: 2531-7906/ 2558-7586 / 9883-8948

**EXPLICAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA AOS PARTICIPANTES**

**1.1- Propósito do estudo**

O propósito desse estudo é avaliar o impacto de diferentes eventos imunes em pacientes com neuromielite óptica (NMO) e compará-los com indivíduos saudáveis e com pacientes com esclerose múltipla (EM). Assim podemos identificar alguns parâmetros que possam estar implicados na NMO.

**1.2- Procedimentos**

Durante a consulta clínica com o médico, uma vez estabelecido o diagnóstico de NMO, o médico fará algumas perguntas de relevância para o nosso estudo. Essas perguntas objetivam avaliar relatos de intercorrências clínicas de relevância imunológica, tais como o número de episódios de surtos ao ano, ocorrência de reações alérgicas e de outras imunopatologias, com definição do tipo de desordem imunológica de fundo auto-imune.

Após a entrevista, e com o consentimento oral e por escrito do paciente, o médico irá colher o volume total de 20 mL de sangue periférico que será utilizado para realizar uma avaliação quantitativa e qualitativa de seu sistema imune.

### **1.3- Riscos e desconfortos**

A aplicação das perguntas não oferece nenhum tipo de risco ou desconforto. Caso você esteja se sentindo desrespeitado, pode interrompê-lo a qualquer momento. A obtenção do sangue periférico será conduzida por seu médico e utilizará todo o material sob condições adequadas.

### **1.4- Benefícios**

Os resultados obtidos pelo estudo serão analisados pelo nosso grupo. Estes resultados poderão fornecer informações importantes relacionadas à NMO. Mas, eles podem não lhe trazer benefícios imediatos, desde que são necessários vários anos de estudos em um número elevado de pacientes. No entanto, caso os achados sejam significativos, o seu médico terá acesso a todos eles e poderá, caso julgue necessário, apresentá-los a você.

### **1.5-Alternativas para a participação**

Sua participação nesse estudo é voluntária. Você poderá interromper a entrevista ou não permitir a coleta de seu sangue a qualquer momento, sem nenhum problema para

você. Você também poderá se retirar do estudo a qualquer momento sem nenhum prejuízo quanto ao seu atendimento pela equipe médica hospitalar.

### **1.6- Custos e compensações**

Você não pagará nada para participar nesse estudo. Você não será pago por estar no estudo.

### **1.7- Confidenciabilidade**

Este estudo envolve informações confidenciais. Essas informações serão mantidas estritamente confidenciais entre os membros envolvidos na pesquisa. Qualquer publicação científica dos resultados não identificará você.

### **1.8- Direito para se retirar da pesquisa**

Sua participação é voluntária. Você não é obrigado a participar nessa pesquisa. Você é livre para interromper a qualquer momento sua participação.

### **1.9- Perguntas ou problemas**

Se você tem alguma pergunta ou problema quanto a esse estudo, entre em contato com Dr<sup>a</sup>. Regina Maria Papais Alvarenga ou Dr<sup>a</sup>. Cleonice Alves de Melo Bento, professora e Imunologista da UNIRIO tel: 2264-2723 ou 2531-7906.

### **1.10- Consentimento**

Uma vez que você leu (ou lhe foi explicado) e entendeu o propósito desse estudo, os procedimentos que serão realizados, os riscos e benefícios, e você **VOLUNTARIAMENTE** concorda em fazer parte desse estudo, favor assinar seu nome abaixo:

Nome do Indivíduo entrevistado:

Assinatura do Indivíduo entrevistado:

Eu expliquei o propósito do estudo para o paciente. Ao meu entender, ela entendeu o propósito, procedimentos, riscos e benefícios desse estudo.

Nome do Investigador:

Assinatura do Investigador:

Testemunha:

Assinatura da Testemunha:

Data:



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP-UNIRIO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - UNIRIO**

**PARECER CONSUBSTANCIADO**

TTDD:232

Assunto: Projetos de Pesquisa – Avaliação.

**Protocolo CEP-UNIRIO:** 0042/2011 **FR** 460879 **CAAE:** 0050.0.313.000-11

**Projeto de Pesquisa:** Avaliação fenotípica e funcional de Linfócitos T de pacientes com neuromielite óptica.

**Versão do Protocolo e Data:** 09/09/2011.

**Pesquisador(a) Responsável:** Cleonice Alves de Melo Bento.

**Instituição:** Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO.

**Sumário do protocolo:**

- **Objetivos:** avaliar o perfil imunológico de pacientes com neuromielite óptica (NMO) em resposta a diferentes estímulos antigênicos; avaliar a proliferação dos linfócitos T mediante ativação por diferentes antígenos e patógenos; a frequência de diferentes subpopulações de células T no sangue periférico de pacientes com Neuromielite Óptica; a frequência e a situação funcional das células dendríticas no sangue periférico dos pacientes em questão; o impacto de diferentes neurotransmissores do stress na função in vitro das células T dos pacientes com NMO; quantificar a produção in vivo e in vitro de citocinas relacionadas aos fenótipos inflamatórios e anti-inflamatórios de células T nos pacientes com NMO.

- **Súmula do Projeto:** o projeto tem como foco o estudo da neuromielite óptica, doença desmielinizante do sistema nervoso central. O status funcional de células imunológicas de pacientes será avaliado. Serão utilizados pacientes do Hospital da Lagoa, com critério de inclusão o diagnóstico dos diversos tipos de NMO, e exclusão obesidade mórbida, consumo de álcool e tabaco. Ocorrerá a coleta de 20 mL de sangue para quantificação de células imunológicas e estudo de cultura de células para avaliação de proliferação e viabilidade celular. Para as análises estatísticas serão utilizados testes não paramétricos.

- **Comentários do Relator:** projeto de relevância científica e adequadamente discutido na sua introdução, justificativa e metodologia. Foi descrito o destino da cultura de celular; definição pelo pesquisador do período de tempo para seleção dos pacientes na metodologia e o esgotamento amostral; O cronograma está adequado.

- **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido:** está de acordo com as Normas da Resolução 196/96.



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP-UNIRIO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - UNIRIO**

- O sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.
- O pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

- Informo que a autorização para posterior publicação fica condicionada á apresentação do resumo do estudo proposto á apresentação.

Diante do exposto, o Comitê de ética em Pesquisa da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – CEP –UNIRIO, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS196/96 e suas complementares, manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

Emitimos, portanto, parecer que classifica o projeto como **APROVADO**.

Rio de Janeiro, 18 de novembro de 2011.

Fabiana Barbosa Assumpção de Souza  
Coordenadora do CEP-UNIRIO

Fabiana B. Assumpção de Souza  
Coordenadora  
CEP - UNIRIO  
PROPG-DPQ