

DANNIE EIKO MAEDA HALLAL LONGO

**“EFEITO DA IMUNOTERAPIA COM IFN β NA REGULAÇÃO
DA RESPOSTA IMUNE NA ESCLEROSE MÚLTIPLA E NA
ENCEFALOMIELITE EXPERIMENTAL AUTO-IMUNE”**

200413624

CAMPINAS

2003

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE**

DANNIE EIKO MAEDA HALLAL LONGO

**“EFEITO DA IMUNOTERAPIA COM IFNB NA REGULAÇÃO
DA RESPOSTA IMUNE NA ESCLEROSE MÚLTIPLA E NA
ENCEFALOMIELITE EXPERIMENTAL AUTO-IMUNE”**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas, da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre
em Clínica Médica, Área de Ciências Básicas.*

Orientadora: Profa. Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos

CAMPINAS

2003

UNIDADE 98
 Nº CHAMADA ILUNICAMP
L864e
 V EX
 TOMBO BC/ 59461
 PROC. 16-117-04
 C ☐ D ☒
 PREÇO 91,00
 DATA _____
 Nº CPD _____

Bib id 322353

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
 UNICAMP**

L864e

Longo, Dannie Eiko Maeda Hallal

“Efeito da imunoterapia com IFN β na regulação da resposta imune na Esclerose Múltipla e na Encefalomielite Experimental auto-imune” / Dannie Eiko Maeda Hallal Longo. Campinas, SP : [s.n.], 2003.

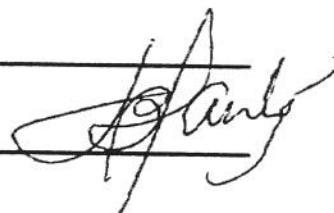
Orientador : Leonilda Maria Barbosa dos Santos

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. *Auto - imunidade. 2. Esclerose múltipla. I. Leonilda Maria Barbosa dos Santos. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

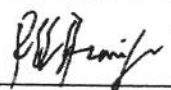
Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador(a): *Profa.Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos*

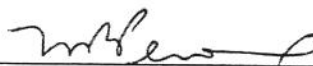


Membros:

1. Professor Doutor Paulo Maria Ferreira Araújo



2. Professora Doutora Maria Terezinha Peraçoli



**Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas,
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.**

Data: 28/11/03

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida que sempre me apoiaram e contribuíram para no que hoje eu me tornei, meus pais Luiz Hallal Filho e Fumiyo Maeda Hallal, e meu marido, Wagner Longo de Castro.

Agradeço em primeiro lugar a *Deus e Nossa Senhora Aparecida*, por me darem sempre oportunidades maravilhosas nesta vida.

Agradeço a Profa. Dra. *Leonilda Maria Barbosa dos Santos*, orientadora dedicada a este trabalho, pelo grande exemplo que representa na minha formação pessoal e profissional, constante apoio, compreensão e carinho que sempre existiram e principalmente, pela garra e força de vontade que a cada dia me inspira a realizar os meus ideais.

Agradeço a minha família: meu amado marido *Wagner*, meus pais *Luiz e Fumiyo*, irmãos *Érika e Keith* e meus avós que sempre acreditaram em mim e apoiaram todas as minhas decisões.

Agradeço especialmente a querida amiga *Elaine Conceição de Oliveira*, que é uma das melhores pessoas; dedicada, amiga e companheira de trabalho, que eu pude conhecer na minha vida.

Agradeço aos meus pacientes portadores de Esclerose Múltipla pela constante ajuda no desenvolvimento deste trabalho, amizade e confiança.

Agradeço ao Prof. Dr. *Benito Pereira Damasceno* e aos seus residentes *Clodoaldo Pirani Jr, Glauco Camargo Igliori e Ana Lúcia Andrade Noronha*, por facilitarem o acesso aos pacientes no ambulatório de Neurologia do Hospital das Clínicas da UNICAMP.

Agradeço a enfermeira *Leda* e as auxiliares de enfermagem, *Solaine, Edna e Ruth*, do ambulatório de Neurologia do Hospital das Clínicas da UNICAMP, por estarem sempre ao meu lado me auxiliando.

Agradeço a *Blanca Maria Diaz-Bardales, Silvia Mansur Scagliuse Novaski e Célia Garcia* amigas queridas que me ajudaram sempre que precisei.

Agradeço aos colegas de trabalho do laboratório de Neuroimunologia (L4) *Carlos Otávio Brandão, Alexandre Góes, Flávia Garcia, Sandra Mirandola, Alessandro Farias, Juliana Contien, Marcelo Soares e Paula* que contaminam o ambiente de alegria e sempre de uma forma ou de outra contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço aos técnicos do nosso laboratório *Gislaine Brito e José Roberto Estrada*, que estavam sempre prontos a me auxiliar.

Agradeço a todo pessoal do Departamento, incluindo alunos e funcionários, que contribuíam para ajudar na pesquisa.

Agradeço às queridas amigas *Fernanda Pereira e Marta* do Laboratório de Marcadores Celulares do Hemocentro que ajudavam nas leituras das amostras no Citômetro de Fluxo, sempre com muito carinho.

Agradeço a FAPESP, pelo auxílio financeiro.

“As pessoas que vencem neste mundo são as que procuram as circunstâncias de que precisam e, quando não as encontram, as criam”

Bernard Shaw

RESUMO.....	PÁG. x
ABSTRACT.....	xii
1-INTRODUÇÃO.....	14
2-OBJETIVOS.....	33
3- CAPÍTULOS.....	35
CAPÍTULO 1-“ <i>Costimulatory Molecules Expression on leukocytes from mice with Experimental Autoimmune Encephalomyelitis treated with Interferon Beta</i> ”.....	36
CAPÍTULO 2-“ <i>Diminished myelin-specific T cell activation associated with increase in CTLA4 and Fas molecules in Multiple Sclerosis patients treated with Interferon beta</i> ”.....	43
4-DISSCUSSÃO GERAL.....	74
5-CONCLUSÃO GERAL.....	80
6-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS

AICD	Morte Celular Induzida por Antígeno
ConA	Concanavalina A
CSF	Líquido céfalo-raqueano
E.A.E.	Encefalomielite Experimental Auto-imune
E.M	Esclerose Múltipla
E-selectina	Molécula de Adesão ao endotélio-leucócito
ICAM-1	Molécula Intracelular de Adesão
IFN β	Interferon beta
IFN γ	Interferon gama
MAG	glicoproteína associada a mielina
MBP	Proteína Básica de Mielina
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MOG	glicoproteína de mielina do oligodendrócito
MRI	Imagem de Ressonância Magnética
<i>M</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
PHA	Fitohemaglutinina
PLP	Proteolipoproteína
SNC	Sistema Nervoso Central
TNF α	Fator de Necrose Tumoral
TGF β	Fator Transformador de Proliferação
TCR	Receptor de Célula T
VCAM-1	Molécula de Adesão Vascular

RESUMO

Uma das abordagens terapêuticas não específica utilizada no tratamento da Esclerose Múltipla é o Interferon beta (IFN β). A Esclerose Múltipla (E.M) é uma doença auto-imune que se caracteriza por inflamação e desmielinização de múltiplas áreas da substância branca do SNC, com posterior lesão do oligodendrócito, resultando clinicamente em disfunção neurológica. O modelo experimental que apresenta muitos aspectos clínicos e histológicos para esta doença é a Encefalomielite Experimental Auto-imune (E.A.E), causada por linfócitos T CD4 tipo Th1, podendo ser induzida em murinos pela inoculação de clones auto-reativos aos componentes da mielina como a proteína básica de mielina e a proteolipoproteína.

A obtenção de tolerância aos antígenos próprios, resulta em mecanismos que levam à supressão de clones de linfócitos específicos para os componentes da mielina como a regulação através de citocinas, e deleção e a anergia dos clones auto-reativos. Diante disso, resolvemos acompanhar o efeito da terapia com IFN β sobre a participação de algumas moléculas envolvidas com a doença. Com relação a deleção, observamos o aumento da molécula Fas, tanto na superfície como na sua forma solúvel, detectada em linfócitos e no soro dos pacientes com E.M, incubando-os com os devidos anticorpos e analisando em citômetro de fluxo e ELISA, respectivamente. Com relação a anergia, observamos diminuição de CD80 (que ativam linfócitos Th1) e um aumento significativo na expressão CTLA4, quando quantificamos em linfócitos de murinos com E.A.E, incubando as células com os devidos anticorpos. Foi detectado também, um aumento nos níveis de CTLA4 intracelular (marcador responsável pela regulação negativa dos linfócitos) em pacientes com E.M, incubando as células com os devidos anticorpos e analisando em citometria de fluxo. Paralelamente, estudamos o efeito *in vitro* dos linfócitos de murinos e humanos afetados, incubando-os com neuroantígenos e analisando em Cintilador Beta.

Concluimos com os dados obtidos nesse estudo que o IFN β , modifica vários aspectos da resposta imunológica, fazendo com que clones de linfócitos T respondessem bem menos aos neuroantígenos, sugerindo que estes linfócitos podem estar sendo imunorregulados por anergia ou por apoptose, quando comparados ao grupo não tratado e grupo controle.

ABSTRACT

One of the non-specific therapeutic approach used in the Multiple Sclerosis treatment is the Interferon β (IFN β). Multiple Sclerosis (MS) is an auto-immune disease characterized by the inflammation and demyelination of multiple areas of the white matter of Central Nervous System, with oligodendrocyte lesion resulting in a clinically determined neurological dysfunction. The experimental model that shows several clinical and hystological aspects for this disease is the Experimental Auto-immune Encephalomyelitis (EAE) mediated by Th1 type CD4 T lymphocytes that can be induced in murines by the inoculation of neuroantigens like Myelin Basic Protein and Proteolypoprotein.

The development of tolerance to the self antigens results in mechanisms which lead to the supression of specific lymphocyte clones for the myelin components. These mechanisms can be cytokine regulation, deletion and anergy of auto-reactive clones. Furthermore, we accompanied the effects of IFN β therapy over some of these molecules involved in MS. Regarding deletion, we observed increased Fas molecule levels in both surface and soluble forms. We detected the surface form in lymphocytes incubating with their antibodies and finally analysed in flow cytometry and the soluble form in sera of MS patients with ELISA. Regarding anergy, we observed a decreasing in CD80 (that activates Th1 lymphocytes) levels and a significantly augment in the CTLA4 levels when we verified in murine lymphocytes with EAE, incubating the cells with their antibodies. The increasing of CTLA4 intracellular (marker responsible for the downregulation of activated lymphocytes) levels was detected in MS patients, incubated with their antibodies and analysed in flow cytometry. In the same time, we studied the lymphocytes of murines and humans affected in vitro, incubating them with neuroantigens and further analysing in cintilador beta.

Therefore, we concluded with the data acquired in this study that the effect of IFN β modifies several aspects of immune response, thus, the T lymphocyte clones responded much less to the neuroantigens, suggesting these lymphocytes could be immunoregulated by anergy or apoptosis when compared to the non treated or control group.

1- INTRODUÇÃO

A Encefalomielite Experimental Auto-imune (E.A.E) começou a ser estudada após a descoberta da vacina contra a raiva, por Pasteur, no ano de 1875. Esse tratamento anti-rábico consistia em injetar, na pessoa infectada, medula de coelho raivoso triturada em solução fisiológica. A vacina foi benéfica para muitos indivíduos, no entanto, um número significativo de pacientes desenvolvia uma paralisia, muitas vezes fatal (Encefalomielite pós-vacinal). Estudos posteriores mostraram que a injeção repetida do extrato de mielina do sistema nervoso central provocava uma encefalomielite também em macacos. A E.A.E passou então, a ser considerada modelo experimental para o estudo dos mecanismos imunopatológicos nas doenças inflamatórias desmielinizantes de natureza auto-imune.

A E.A.E é mediada por linfócitos T CD4, manifesta-se clinicamente por deficiência neurológica, histologicamente caracteriza-se por infiltração perivascular de células mononucleares no encéfalo e imunologicamente pela presença de resposta celular e humoral aos componentes da mielina (SWANBORG, 1995; JAVED *et al.*, 1995).

A doença pode ser induzida em animais geneticamente susceptíveis, pela imunização com mielina e seus componentes como a proteína básica de mielina (MBP), proteolipoproteína (PLP), glicoproteína associada à mielina (MAG), glicoproteína de mielina do oligodendrócito (MOG) e peptídeos encefalitogênicos derivados desses antígenos, ou ser transferida para animais normais por clones de linfócitos sensibilizados a estes componentes (BEN-NUN e COHEN, 1982; VANDENBARK *et al.*, 1985; SWANBORG, 1995).

Dependendo do animal utilizado, a doença se apresenta de forma aguda monofásica ou crônica com surtos e remissões. Os ratos Lewis desenvolvem a forma aguda e monofásica da doença. A E.A.E monofásica é caracterizada pelas lesões inflamatórias e sinais clínicos reversíveis, reproduzindo clinicamente, em ratos, um episódio de exacerbação da Esclerose Múltipla. Durante a evolução da doença observa-se o desenvolvimento de sinais clínicos ascendentes identificados pela hipotonia distal da cauda que evolui rapidamente para uma paraplegia completa, com hipoestesia das patas dianteiras e incontinência. Os sinais clínicos desaparecem espontânea e progressivamente, sendo que no vigésimo dia após a imunização, é observada completa recuperação da doença. A E.A.E pode ser transferida através de linfócitos sensibilizados aos neuroantígenos e esse processo evolui em uma semana (LIDER *et al.*, 1989). Os camundongos são mais resistentes ao

desenvolvimento a E.A.E e apresentam a forma surto e remissão da doença. Pelo fato de apresentar muitos aspectos clínicos e histológicos em comum com a Esclerose Múltipla, o modelo vem sendo utilizado para o estudo da mesma (WEINER *et al.*, 1994).

A Esclerose Múltipla é a mais importante doença desmielinizante que acomete o homem normalmente adultos jovens (entre 15 e 50 anos). A prevalência da E.M é maior no norte dos Estados Unidos, Canadá e Europa. Não temos informação sobre a incidência ou o padrão imunogenético dos pacientes no nosso meio. A doença é caracterizada pela inflamação e desmielinização da substância branca do SNC com posterior lesão do oligodendrócito, destruição axonal, aumento da síntese de imunoglobulina intratecal, predominando a IgG no líquido céfalo-raqueano (CSF) e falta de alterações patológicas em outros órgãos (WAKSMAN, 1985; HAFER *et al.*, 1989; JOHNSON *et al.*, 1977).

A doença se apresenta sob diferentes formas clínicas como: cronicamente progressiva primária ou secundária e na forma de surtos e remissões (POSER *et al.*, 1983). Na forma de surtos e remissões, a E.M evolui por surtos seguidos por períodos de remissão com recuperação completa ou quase completa. No entanto, a incapacidade aumenta gradualmente com o tempo, embora o curso seja imprevisível e as remissões possam durar anos. A forma surto-remissão pode evoluir para a progressiva secundária. A recuperação das exacerbações passa a ser incompleta, causando uma progressiva deterioração da condição física. Na forma E.M progressiva primária, a condição clínica do paciente deteriora continuamente, sem o aparecimento de surtos (POSER *et al.*, 1983; LUBLIN e REINGOLD, 1996).

A etiologia da E.M é desconhecida, mas admite-se que se trata de uma doença multifatorial de natureza auto-imune, onde o fator ambiental, provavelmente de origem infecciosa e a susceptibilidade genética parecem ter um papel essencial na sua determinação (STEINMAN, 1996).

Os mecanismos imunológicos envolvidos na E.M não estão completamente entendidos, a explicação mais aceita é que durante o período de exacerbação, o indivíduo apresenta deficiência na função imunorreguladora, que normalmente o organismo exerce sobre os linfócitos T CD4+ auto-reativos para os componentes da mielina (WEINER *et al.*, 1994).

O auto-antígeno envolvido na formação do complexo MHC-antígeno não está totalmente conhecido, mas a MBP e a PLP, componentes da mielina estão sendo muito bem estudados, devido à participação na gênese do modelo experimental (WAKSMAN, 1985).

Embora a E.M seja uma doença órgão-específica, com resposta imune voltada para os componentes do SNC, estudos mostram várias alterações imunológicas no sangue periférico. Linfócitos T ativados que reconhecem especificamente a MBP e outros componentes da mielina, alteração no padrão de síntese de citocinas e de seus receptores foram descritos no sangue periférico dos pacientes (HAFLER e WEINER, 1989; OTA *et al.*, 1990; COSTA *et al.*, 2000).

Os linfócitos T auto-reativos normalmente circulam no sangue e líquido céfalo-raqueano e devem deixar a circulação para terem acesso ao sistema nervoso central e dar início à reação inflamatória, que culminará com a desmielinização. A circulação celular é mediada por uma série de moléculas de adesão que são expressas tanto no endotélio como nos leucócitos (SPRINGER, 1994). Normalmente, as células endoteliais apresentam baixa adesividade aos leucócitos, no entanto, a expressão dessas moléculas de adesão aumentam sob a ação de citocinas geradas durante o curso da resposta inflamatória (SPRINGER, 1994; BEVILAQUA, 1993), permitindo que os leucócitos possam aderir e migrar para o tecido inflamado. Vários autores observaram aumento na expressão de algumas moléculas de adesão como ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina na E.M, evidenciando que estes endotélios estavam ativados pela reação inflamatória (WASHINGTON *et al.*, 1994; DORE-DUFFY *et al.*, 1995; TSUKADA *et al.*, 1993). O aumento dos níveis das moléculas de adesão no soro e líquido céfalo-raqueano dos pacientes com E.M correlacionam com o dano da barreira hemato-encefálica e lesões desmielinizantes (SHARIEF *et al.*, 1993; HARTUNG *et al.*, 1995), evidenciando que essas moléculas participem do processo inflamatório de uma forma geral e nos mecanismos de desmielinização auto-imune em particular.

A tolerância aos antígenos próprios é obtida graças aos mecanismos que levam à supressão dos clones de linfócitos específicos para os componentes da mielina. Entre os mecanismos mais estudados citamos: a regulação da resposta imune através das citocinas, anergia e deleção dos clones auto-reativos.

O estudo da biologia das citocinas tem auxiliado a entender a regulação da resposta imune. MOSMANN e colaboradores (1986) mostraram que a estimulação antigênica de linfócitos CD4 *in vitro* resultava no desenvolvimento de células produzindo determinados padrões de linfocinas. Assim, as células CD4 foram divididas em duas populações funcionalmente distintas que foram amplamente confirmadas tanto no modelo em murinos, como em humanos (MILLER *et al.*, 1998; CORREALE *et al.*, 1998). As células Th1 produzem IFN γ , IL2 e TNF α e são responsáveis pela ativação de macrófagos, citotoxicidade e reações de hipersensibilidade tardia (DTH). As células Th2 produzem IL4, IL5, IL6, IL10 e são responsáveis pela função helper na resposta imune humoral (LIBLAU *et al.*, 1995). Um terceiro subtipo (Th3) identificado na mucosa intestinal produz quantidades consideráveis de fator transformador de proliferação (TGF β) durante o processo de indução de tolerância oral (CHEN *et al.*, 1994).

A diferenciação das células T CD4 em subtipos de células efectoras é determinado pelo tipo de citocinas produzidas no momento do reconhecimento do antígeno. Citocinas como a IL12, presentes no microambiente onde a resposta imune se desenvolve, induzem as células CD4 (Th0 precursoras) a se diferenciar em Th1, enquanto que a IL4 é essencial para a diferenciação das células tipo Th2 (LIBLAU *et al.*, 1995). Além disso, uma vez que uma sub-população se desenvolve, ela produz citocinas que suprimem a diferenciação da outra sub-população, resultando na polarização da resposta imune.

Evidências clínicas e experimentais sugerem que as células Th1 estão envolvidas na gênese das doenças auto-imunes órgão-específicas como a E.A.E e E.M. Citocinas com ação pró-inflamatória foram detectadas no SNC durante a fase aguda tanto da E.M como no modelo experimental da doença (KUCHROO *et al.*, 1993; LIBLAU *et al.*, 1995). Estudos imunohistoquímicos mostraram a presença de TNF α e TNF β nas lesões de desmielinização na E.M aguda e crônico-aguda (NAVIKAS e LINK, 1996). Alguns autores mostraram que a determinação dos níveis de TNF α tanto do sangue periférico, como no líquido céfalo-raquiano, pode ser utilizada para prever o aparecimento dos surtos em pacientes com E.M (CHOFFON *et al.*, 1993). No entanto, durante a fase de recuperação da doença, observou-se um aumento na expressão de citocinas do tipo Th2 (CORREALE *et al.*, 1995; NAVIKAS e LINK, 1996).

Estudos têm mostrado a importância da citocina IL12, responsável na geração de células Th1. Na E.A.E, o tratamento com esta citocina aumenta a severidade e duração da doença. Por outro lado, anticorpos anti-IL12 previne os surtos na E.A.E. Foi também encontrado que animais geneticamente deficientes para IL12 apresentam resistência à doença (KARP *et al.*, 2000). Em pacientes portadores de E.M na forma surto-remissão, foi observado um aumento significativo desta citocina (LOS Y *et al.*, 2002).

Com relação a citocina IL10, foi observada a inibição da produção de citocinas por células Th1 (LIU *et al.*, 2001) e diminuição da capacidade de apresentação de antígeno por macrófagos (HUANG *et al.*, 2001). Com relação a participação do fator transformador de proliferação (TGF β), foi demonstrado que os pacientes com E.M ativa produzem níveis reduzidos desta citocina quando comparado ao grupo controle (MOKHATARIAN *et al.*, 1994; JOHNS *et al.*, 1991). Foi observado que TGF β , pela ação anti-inflamatória que exerce, reduz a gravidade da E.A.E (MILLER *et al.*, 1993).

Estas evidências sugerem a importância das células Th1, Th2 e Th3 com suas respectivas citocinas no controle dos surtos e remissões na E.A.E e E.M.

Quanto aos outros mecanismos de controle dos clones auto-reativos, a deleção obtida principalmente pela indução de apoptose é um mecanismo central de grande importância. A apoptose é um mecanismo central na embriogênese e morfogênese, no desenvolvimento do sistema nervoso, na eliminação de células senescentes ou indesejáveis (neoplásicas e outras), na destruição de células infectadas por vírus e, ainda na resposta a estímulos agressivos. Estudos ressaltam uma distinção clara entre necrose e apoptose. A necrose é uma forma de morte celular degenerativa e incontrolável, provocada normalmente por um estímulo ambiental agressivo: hipertermia, radiação e uma variedade de agentes físicos e químicos, entre outros grupos. A apoptose também pode ser desencadeada por estes agentes, mas é essencialmente um processo fisiológico. A morte celular por apoptose envolve o reconhecimento de um sinal específico e a intervenção de sistemas complexos de regulação.

Durante o desenvolvimento intratímico, a apoptose está envolvida na seleção negativa ou deleção clonal de células T auto-reativas durante o estágio duplo-positivo (CD4+CD8+) (MAC DONALD *et al.*, 1990). No entanto, com relação aos clones

específicos para os neuro-antígenos, sabe-se que esse mecanismo não garante totalmente a destruição dos mesmos, que podem ser encontrados na periferia, mesmo no caso de indivíduos sãos (OTA *et al.*, 1990).

Pelo menos dois mecanismos são responsáveis pela indução de apoptose dos linfócitos T maduros. O primeiro seria através da citotoxicidade clássica, dependendo da ação de perforinas e granzimas e o segundo a apoptose induzida pelo antígeno, através da estimulação do TCR, mecanismo que envolve a expressão da molécula Fas, chamado *propriocida ou morte celular induzida pelo antígeno (AICD)* (LENARDO *et al.*, 1999). No primeiro mecanismo, após o reconhecimento do antígeno, as células T citotóxicas liberam grânulos líticos que atuarão na superfície da célula alvo. Esses grânulos são lisossomas modificados que contêm duas classes distintas de proteínas efetoras conhecidas como citotoxina. Uma delas é a perforina que é liberada e gera poros nas membranas das células alvo. A outra classe compreende pelo menos três serina-proteases conhecidas como granzimas. As perforinas e granzimas, em conjunto, induzem a célula alvo a entrar em apoptose, caracterizada pela desintegração celular e fragmentação do DNA em corpos apoptóticos. Há similaridade entre os mecanismos de citotoxicidade e o *propriocida*. No entanto, os dois mecanismos são diferentes, pois o último é autônomo, e não requer a participação de duas células (LENARDO *et al.*, 1999).

Por outro lado, a apoptose induzida pelo antígeno através da estimulação do TCR, envolvendo a ativação da molécula Fas é conhecida como morte programada de linfócitos específicos para o antígeno. Esse mecanismo requer que a célula esteja metabolicamente ativa, permitindo que seja acionado o programa específico e os eventos que levam à sua própria destruição. Normalmente isso acontece em condições ricas em citocinas de crescimento (IL2 ou IL4) e dependendo do nível de estimulação do antígeno, será sinalizado a apoptose celular (LENARDO, 1991; LENARDO *et al.*, 1999; COHEN *et al.*, 1992). Na E.M as células T reativas a MBP podem sofrer apoptose pelos dois mecanismos citados previamente, porém PELFREY e colaboradores (1995) sugerem que estes clones auto-reativos são eliminados com maior frequência pelo mecanismo de morte celular induzida pelo antígeno.

Como foi mencionado, a molécula Fas também conhecida como APO-1 ou CD95 está implicada na indução de apoptose dos linfócitos. A interação do Fas com seu ligante, FasL, leva a ativação do domínio letal na sua cauda citoplasmática que pode iniciar a ativação da cascata celular de caspases, levando à morte das células portadoras de Fas (SUDA *et al.*, 1993). Tanto o Fas como o FasL são moléculas que pertencem à superfamília do receptor TNF/fator de crescimento neural (ITOH *et al.*, 1991; OEHM *et al.*, 1992).

A sinalização do Fas é crucial para a manutenção da tolerância imunológica que é evidenciada em camundongos homozigotos para mutações nos genes para Fas e FasL (WEINTRAUB *et al.*, 1998). Linfócitos T de camundongos *lpr* possuem mutação no gene que codifica a molécula Fas e linfócitos de camundongos *gld* que possuem mutação no gene que codifica a molécula FasL, apresentam defeito na apoptose estimulada pelo antígeno, reforçando a idéia de que a molécula Fas está envolvida na apoptose das células T induzidas pela ativação, um fato que implica em aumento da resposta proliferativa de linfócitos, incluindo células potencialmente auto-reativas (RUSSELL *et al.*, 1993). Similarmente como ocorre na síndrome de Canale-Smith, onde pacientes possuem mutações no gene que codifica a molécula Fas (DRAPPA *et al.*, 1996).

A molécula Fas está amplamente expressa por todo o corpo. As evidências indicam que o FasL é muito mais restrito na sua distribuição e está expresso principalmente em órgãos ricos em células T e células do estroma do olho. O FasL pode ser expresso em quantidades significativamente maior em células T citotóxicas, células NK e células Th1 (DOWLING, *et al.*, 1996).

Os estudos sobre a expressão da molécula Fas na E.M e na E.A.E são polêmicos, pois a apoptose pode estar relacionada tanto com o agravamento da doença, como com a resolução da mesma. Na primeira hipótese, foi demonstrado que linfócitos T CD4 do tipo Th1, que expressam a molécula FasL em sua membrana, pode induzir apoptose quando interagir com a molécula Fas sobre os oligodendrócitos (células formadoras da mielina) aumentando as lesões desmielinizantes e conseqüentemente agravando a doença (D'SOUZA *et al.*, 1996; DOWLING *et al.*, 1996). Citocinas inflamatórias como IFN γ e TNF α podem promover a expressão de Fas nos oligodendrócitos e em outras células da glia, resultando na morte autócrina ou parácrina dos

oligodendrócitos na região onde está havendo a reação inflamatória (De MARIA e TESTI, 1998).

Por outro lado, a expressão da molécula Fas nos linfócitos T CD4 pode estar associada ao processo de apoptose das células envolvidas na gênese da E.M, e a ausência ou diminuição dela, pode ser indicativo da disfunção que resulta no resgate da apoptose dos clones auto-reativos, levando à exacerbação da doença. Vários trabalhos demonstram que a deleção dos clones auto-reativos a MBP, por apoptose, resulta na recuperação da E.A.E (BAUER *et al.*, 1998; MC COMBE *et al.*, 1996; PENDER *et al.*, 1991; PENDER *et al.*, 1992; TABI *et al.*, 1994; DIAZ-BARDALES *et al.*, 2002). Trabalho realizado em nosso laboratório tem mostrado aumento dos níveis de apoptose de linfócitos reativos à MBP no baço de ratos Lewis, na fase de remissão da E.A.E, sugerindo que a deleção clonal esteja diretamente envolvida nos períodos de remissão da doença (DIAZ-BARDALES *et al.*, 2002).

Com relação ao nível sérico da molécula Fas, a interpretação também é difícil. Os receptores solúveis representam formas truncadas do receptor ligadas à membrana e pode se ligar ao FasL de outras células da mesma forma que o seu correspondente de membrana (CHENG *et al.*, 1994). Nível elevado desta molécula solúvel está presente no Lupus Eritematoso Sistêmico (SLE) e o Fas solúvel é capaz de inibir a apoptose mediada por Fas e alterar o desenvolvimento e a proliferação dos linfócitos nas respostas para os auto-antígenos, sugerindo um papel crítico desta molécula solúvel nas doenças auto-imunes (CHENG *et al.*, 1994). No entanto, essa propriedade da molécula solúvel foi questionada por GOEL e colaboradores (1995) que sugeriram que o Fas solúvel não possui papel na patogênese da doença auto-imune.

ZIPP e colaboradores (1998) demonstraram que os níveis da molécula Fas estão aumentados no soro de pacientes portadores de E.M, na forma surto-remissão. Eles observaram que o nível aumentado desta molécula não se correlacionou com o grau de comprometimento motor (EDSS) dos doentes, nem com a frequência das lesões identificadas pela ressonância nuclear magnética. Com relação ao tratamento com IFN β , foi observado a correlação positiva entre a formação de anticorpos neutralizantes e o aumento dos níveis de CD95.

ZHOU e HANS (2000) também observaram Fas solúvel significativamente aumentado no soro e no LCR de pacientes com E.M. quando comparado ao grupo controle e com outras desordens neurológicas. Pacientes com E.M em atividade apresentam níveis elevados de Fas solúvel quando comparado com a forma inativa, isso sugere que o Fas solúvel pode estar relacionado com a atividade clínica da doença.

Outro aspecto importante que vem sendo abordado atualmente com relação à regulação da resposta imune, é a expressão de moléculas coestimulatórias na ativação dos linfócitos T.

A primeira evidência demonstrando que a ligação do receptor do antígeno com o peptídeo, no contexto da molécula de MHC, não era suficiente para a ativação dos linfócitos T, foi feita por MUELLER, JENKINS e SCHWARTZ (1989). Estes autores demonstraram claramente que clones de linfócitos T que recebiam somente a interação CD3/TCR-peptídeo e MHC, não somente resultava na falha de indução da resposta imune, como também na inativação funcional das células T maduras, levando a um estado de ausência de resposta ou anergia. Os autores mostraram que a ativação era dada também pela presença de um segundo sinal coestimulatório, fornecido por moléculas presentes na superfície das células apresentadoras de antígeno. Por essa razão, os autores sugerem que a ausência de coestimulação serve para induzir e manter a tolerância das células T aos antígenos próprios e a aberrante estimulação das moléculas coestimulatórias resultaria em auto-imunidade.

Vários pares de moléculas coestimulatórias estão envolvidas na ativação das células T (JUNE *et al.*, 1990). Análise da via de ativação das moléculas B7-CD28/CTLA4 tem mostrado a importância desse complexo em manter o equilíbrio da tolerância. A sinalização dessa via é muito complexa, pois envolve a existência de pelo menos dois ligantes B7.1 (CD80) e B7.2 (CD86) e dois receptores: CD28 e CTLA-4 (CD152), juntas essas moléculas apresentam potencial para sinalização positiva e negativa na ativação dos linfócitos T (LENSCHOW *et al.*, 1996).

Estudos realizados *in vivo* com anticorpos anti-CD80 e anti-CD86 sugerem que estas moléculas atuem de formas distintas nas doenças auto-imunes. A E.A.E ativamente induzida é protegida pelo tratamento com o anticorpo anti-CD80, mas torna-se mais severa

quando se utiliza o anticorpo anti-CD86 (KUCHROO *et al.*, 1995). Durante o período de exacerbação da E.A.E ocorre um aumento significativo da molécula CD80 nas células apresentadoras de antígeno e células B infiltrados no tecido nervoso, induzindo uma resposta celular tipo Th1 com liberação de citocinas inflamatórias e conseqüente destruição da micróglia (MILLER *et al.*, 1995). Entretanto, a resolução da E.A.E se correlaciona com um aumento da molécula CD86 que leva a geração de células Th2, liberando citocinas como IL4 e IL10 que inibe a ativação de células Th1 e protegem a E.A.E. Dessa forma, a expressão de CD80 e CD86 regula a severidade da E.A.E e é potencialmente relevante na E.M (KUCHROO *et al.*, 1995; GENÇ *et al.*, 1997).

Na E.M estudos indicam que a expressão de CD80 nas micróglias ativadas e a presença de infiltrados de monócitos estão aumentados nas lesões ativas no cérebro de pacientes (De SIMONE *et al.*, 1995; WILLIAMS *et al.*, 1994). GENÇ e colaboradores (1997) demonstraram que o número de linfócitos B CD80+ está aumentado significativamente durante o período de surto na E.M.

CTLA4 e CD28 são moléculas homólogas, porém com diferenças funcionais importantes. A molécula CD28 é constitutivamente expressa na superfície das células T e quando interage com seus co-receptores na superfície das células apresentadoras de antígeno (CD80 e CD86), afeta todos os eventos subseqüentes à ativação linfocitária, como indução de múltiplas citocinas e o aumento da expressão dos receptores de IL2 nas células T previamente ativadas.

Com relação à molécula CTLA4, estudos utilizando anticorpos monoclonal anti-CTLA4 forneceram as primeiras evidências sobre a função dessa molécula. A utilização desses anticorpos mostrou aumento da resposta proliferativa dos linfócitos (WALUNAS *et al.*, 1994). Inicialmente este efeito foi interpretado como evidência da participação positiva da molécula CTLA4 aumentando e sustentando a coestimulação mediada pelas moléculas B7. Estudos subseqüentes, no entanto, sugeriram que os anticorpos anti-CTLA4 bloqueavam sinais inibitórios para a ativação das células T, através da transdução feita pelo complexo B7/CTLA4 (KRUMMEL e ALLISON, 1995).

Na E.A.E induzida em camundongos, foi demonstrado que a administração *in vivo* de anticorpos monoclonais anti-CTLA4 a animais recipientes de células reativas para o peptídeo de PLP aumenta a severidade da doença, indicando que esta molécula está

relacionada a um papel na regulação negativa (PERRIN *et al.*, 1996; HURWITZ *et al.*, 1997; KARANDIKAR *et al.*, 2000).

Os mecanismos pelos quais a molécula CTLA4 leva à proteção na E.A.E é uma ativa área de investigação. Vários são os mecanismos que podem explicar o efeito supressor desta molécula, entre eles: a polarização da resposta imune, atuação nas células reguladoras CD4+CD25+ e a indução de apoptose.

Estudo imunohistoquímico do tecido do sistema nervoso central de animais tratados, indicou que a terapia com CTLA4 resulta na inibição da produção de citocinas Th1 no SNC com aumento de citocinas anti-inflamatórias (Th2) como a IL10 e TGFβ (KHOURY *et al.*, 1995; GOMES *et al.*, 2000)

Por outro lado, células com atividade imunossupressora como a população CD4+CD25+ (T_{reg}) expressa constitutivamente a molécula CTLA4 (READ, MALMSTROM e POWRIE, 2000; TAKAHASHI *et al.*, 2000). A população de células reguladoras CD4+CD25+ são células T que expressam CD25 (receptor para IL2) e possuem uma função reguladora potente produzindo citocinas anti-inflamatórias como a IL10 e TGFβ (WEINER e SELKOE, 2002). Takahashi e colaboradores (2000) demonstraram que a CTLA-4 é na verdade uma molécula coestimulatória chave para a ativação das células T reguladoras CD4+CD25+, para que dessa forma, essa população possa suprimir e controlar as células T auto-reativas. O bloqueio do CTLA-4 nas células T_{reg}, leva a perda da autotolerância natural e o aparecimento de doenças auto-imunes.

Está claro que as células T_{reg} existem como parte do repertório imune normal, prevenindo o desenvolvimento de respostas patogênicas para os antígenos intestinais e próprios. READ, MALMSTROM e POWRIE (2000) reportaram que as células T_{reg} que controlam a inflamação intestinal expressam o mesmo fenótipo que aquelas que controlam a auto-imunidade. Eles revelaram que a função imunossupressora das células T_{reg} *in vivo* é dependente da molécula CTLA4 e de citocinas como TGFβ.

Além disso, embora haja controvérsias, acredita-se que um dos mecanismos pelos quais esta molécula regule negativamente a ativação linfocitária seja através da indução de apoptose (GRIBBEN *et al.*, 1995; SCHEIPERS e REISER, 1998).

Os mecanismos periféricos descritos: imunes desvios pela polarização da produção de certas citocinas, apoptose e anergia estão integrados entre si, e a ativação preferencial de um ou de outro ocorre na dependência de fatores tais como a dosagem do antígeno e a forma como ele é apresentado.

Imunoterapia nas doenças desmielinizantes

A abordagem terapêutica para as doenças auto-imunes em geral e na E.M em particular, consiste no emprego de drogas que levam a uma imunossupressão global, durante os períodos de exacerbação da doença. Essas medidas, no entanto, causam sérios efeitos adversos ao organismo. A procura, portanto, de medidas específicas que tenha ação apenas sobre os clones auto-reativos tem motivado inúmeros estudos. Entre as abordagens mais utilizadas podemos citar a indução de tolerância, vacinação com células T, administração de peptídeos e citocinas como interferon beta.

Embora diversas questões ainda precisam ser resolvidas antes da administração sistêmica de auto-antígenos se tornar uma abordagem aceitável no tratamento de doenças auto-imunes humanas, a indução de tolerância aos neuroantígenos, em particular a tolerância obtida pela administração oral de mielina e seus componentes como a MBP e PLP, tem se mostrado um meio efetivo de suprimir a E.A.E e vem sendo sugerida como possível alternativa terapêutica para o tratamento de algumas doenças auto-imunes, entre elas a E.M (WEINER *et al.*, 1994; LIBLAU *et al.*, 1997).

Os mecanismos pelos quais a tolerância oral é mediada incluem deleção, anergia e supressão celular ativa. O fator determinante neste processo encontra-se na dosagem do antígeno administrado: baixas doses favorecem a supressão ativa, enquanto que altas doses levam a anergia e deleção. A supressão ativa é mediada pela indução das células reguladoras do tecido linfóide associado ao intestino (GALT), apresentando uma secreção de citocinas supressoras como TGF β (CHEN *et al.*, 1994; WEINER e REES, 1999; WEINER e SELKOE, 2002).

Esses processos têm início no GALT, que é uma rede imune bem desenvolvida que evoluiu para proteger o indivíduo de proteínas ou patógenos ingeridos. O GALT compreende células linfóides que podem ser separadas em vários compartimentos como as

placas de Peyer, os linfócitos da lâmina própria e os intraepiteliais. Essas células podem ser CD8 e CD4 (tipo Th3) e são responsáveis pela produção de citocinas anti-inflamatórias como TGF β , IL4 e IL10 (WEINER, 1997).

Estudos realizados mostram que a transferência adotiva das células CD8 supressoras, de animais tolerizados, protege os animais receptores do desenvolvimento da E.A.E (WEINER *et al.*, 1994). Na E.M a administração oral de mielina parece não bloquear a progressão da doença, porém esse achado pode ser devido ao uso inadequado da dose ou o tipo de antígeno administrado (WEINER, 2000).

Outra possível estratégia imunoterapêutica conhecida como vacinação com células T (TCV) atua, como em qualquer outro tipo de vacinação, sobre o sistema imune para neutralizar um agente imunopatogênico. Neste caso, a vacina utilizada é composta por células T reativas à mielina, isoladas do sangue, inativadas por irradiação e novamente injetadas no organismo. O TCV difere do modelo de vacinação clássica, pois os agentes a serem combatidos são populações de células T auto-reativas. Essa abordagem consiste em inativar especificamente os linfócitos T reativos a mielina através de um aumento de ativação na rede regulatória periférica (COHEN, 2002).

Os mecanismos das respostas ao TCV ainda não estão completamente esclarecidos. Mas estudos indicam que ambas células T CD8 e CD4 estão envolvidas neste processo. É possível que as células T CD4 produzem citocinas supressoras, que resultará na supressão da doença (HERMANS *et al.*, 1999; ZANG *et al.*, 2000; COHEN, 2002; VANDERAA *et al.*, 2003).

Os resultados promissores sobre a TCV nos modelos experimentais levaram a ensaios clínicos humanos conduzidos para avaliar o efeito terapêutico do TCV como uma estratégia de tratamento na E.M (CORREALE *et al.*, 2000). ZHANG e colaboradores (2002) mostraram um grande potencial no uso da TCV baseados na redução de surtos dos pacientes com E.M.

Um outro tipo de vacinação utilizada para o tratamento de doenças auto-imunes é a imunização de peptídeos de TCR (VANDENBARK *et al.*, 1992). Com relação ao tipo de receptores para antígeno (TCR), os linfócitos T podem ser divididos em duas grandes sub-populações: células que expressam receptores para o antígeno α e β e células que

expressam receptores para o antígeno γ e δ . As células que expressam TCR α e β são melhores estudadas com relação ao desenvolvimento de doenças auto-imunes, como a E.A.E. A manipulação da interação do TCR com os peptídeos derivados dos neuroantígenos e as moléculas do MHC tem sido feita, com o objetivo de inibir a apresentação de antígeno e consequentemente alterar a manifestação da doença.

Essa terapia oferece duas vantagens significativas sobre a terapia imunossupressora tradicional: 1) A terapia de peptídeo de TCR não causa imunossupressão de amplo espectro porque ela modula apenas um pequeno conjunto de células T; 2) Os peptídeos são administrados em baixas doses, não apresentando toxicidade sistêmica em murinos. Entretanto, para essa terapia ser efetiva, as células T auto-reativas devem usar um número limitado de genes TCR V e os peptídeos sintetizados com base nestes genes devem ser capazes de induzir a imunidade peptídeo-específico (BOURDETTE *et al.*, 1994).

Foi demonstrado que as células T reguladoras reativas ao TCR produzem citocinas anti-inflamatórias como a IL4 e a IL10, indicando um fenótipo do tipo Th2, inibindo a produção de IFN γ e proliferação de células Th1 inflamatórias (VANDENBARK *et al.*, 1996; VANDENBARK *et al.*, 2001).

Na E.A.E, as células T específicas que causam a doença preferencialmente usam genes do TCR V da família V β 8.2. Estudos testando este tipo de tratamento imunizaram nestes animais, um peptídeo V β 8.2 sintético para o TCR e foi observado tanto a prevenção como a supressão da E.A.E (VANDENBARK *et al.*, 1989; BURNS *et al.*, 1989; OFFNER *et al.*, 1991). Outros estudos indicam que vacinas desenvolvidas com peptídeos de TCR correspondentes a sequência BV8S2 podem induzir células supressoras e anticorpos que previnem ou reverterem a paralisia clínica na E.A.E (OFFNER *et al.*, 1998).

O grupo de células T que expressa TCR $\gamma\delta$ vem sendo alvo de extensas investigações, no entanto, a função dessa população celular não está completamente esclarecida. Evidências apontam a participação das células T $\gamma\delta$ tanto na patogenia como na recuperação de doenças auto-imunes, principalmente naquelas que possuem um componente inflamatório crônico, como é o caso da Artrite Reumatóide e E.M (WUCHERPFENNIG *et al.*, 1992; PETERMAN *et al.*, 1993; STINISSEN *et al.*, 1995). Nas doenças desmielinizantes existem evidências experimentais que as células $\gamma\delta$ são

capazes de induzir lise de oligodendrócitos *in vivo* (FREEDMAN *et al.*, 1991). A presença de células $\gamma\delta$ tem sido observado em placas ativas, líquido céfalo-raqueano e sangue periférico de pacientes com E.M (SELMAJ *et al.*, 1991) e em infiltrados perivascular no SNC de camundongos com E.A.E (RAJAN *et al.*, 1996), sugerindo um papel patogênico para este tipo celular. Por outro lado, há várias evidências sobre a atividade imunossupressora das células T $\gamma\delta$, resultando em papel protetor em algumas doenças auto-imunes. Na E.A.E, a depleção *in vivo* das células $\gamma\delta$, obtida pela injeção do anticorpo anti-TCR $\gamma\delta$, ocasionou significativo aumento da gravidade da E.A.E, acompanhado de maior síntese de citocinas com efeito anti-inflamatório (KOBAYASHI *et al.*, 1997). Estudos mostraram a ativação de hibridomas de $\gamma\delta$ por um peptídeo (180-196) de PPD (BORN *et al.*, 1990). No modelo animal, o *Mycobacterium tuberculosis* (Mt) é rotineiramente utilizado como agente imunopotenciador na indução da E.A.E. Estudos indicam que a prévia exposição dos animais aos antígenos de Mt, PPD e peptídeo de PPD (180-196), reduziu a gravidade da E.A.E com concomitante aumento da população de linfócitos T $\gamma\delta$ e que essas células quando estimuladas *in vitro* com anticorpo monoclonal anti-TCR $\gamma\delta$ imobilizado na microplaca, produziam altos níveis de TGF β (DIAZ-BARDALES *et al.*, 2001). Esses dados sugerem que essa população celular tenha importante função imunomoduladora.

A administração do acetato de glatiramer surgiu, nos últimos anos, como uma possível abordagem terapêutica. Esse composto foi sintetizado com o nome de copolímero 1, e inicialmente usado para induzir E.A.E. No entanto, o copolímero 1 causou efeito oposto, inibindo o desenvolvimento da E.A.E em cobaias (JOHNSON *et al.*, 1995). Esse composto inibiu a indução de E.A.E em várias espécies, tendo sido proposto sua aplicação na E.M. A administração do Acetato de Glatiramer mostrou eficácia similar ao Interferon beta, reduzindo os períodos de exacerbação na forma surto-remissão da E.M (GE *et al.*, 2000). A ação benéfica do tratamento foi confirmada pela redução do número e volume das lesões ativas, identificadas nas imagens de ressonância magnética (COMI e MOIOLA, 2002). Embora os mecanismos de ação do acetato de glatiramer não estejam totalmente esclarecidos, foi observada modificação da resposta imune como a indução de células T supressoras antígeno-específica, inibição da apresentação de antígeno, polarização da produção de citocinas das células T CD4 Th1 para Th2 (GOODIN, *et al.*, 2001; HUSSEIN

et al., 2001). Por ter alguns aminoácidos em comum com a MBP, a administração oral do acetato de glatiramer teve efeito inibidor na E.A.E e essa via de administração também está sendo testada em pacientes (WEINER e SELKOE, 2002).

Paralelamente à manipulação de células que exercem atividade supressora na resposta imune, a possível administração *in vivo* de citocinas que levem à polarização da produção de mediadores com o efeito anti-inflamatório e dessa forma reduza os danos causados pelas reações auto-imunes, tem sido motivo de vários grupos de pesquisadores.

No campo da imunoterapia não específica, a utilização do Interferon β tem se mostrado a droga mais promissora e formalmente aprovada para o tratamento da E.M, desde a aprovação dos corticosteróides acontecida no início da década de 70 (JACOBS *et al.*, 1996).

A existência do interferon natural foi inicialmente descrita por ISAACS e LINDENMANN em 1957. Esses autores observaram que células infectadas por vírus secretavam uma proteína, a qual denominaram interferon, que agia sobre as células vizinhas impedindo-as de se tornarem infectadas. Subseqüentemente, dois tipos principais de interferons foram reconhecidos: Interferon tipo I: α e β são produzidos virtualmente por todas as células de mamíferos e estão envolvidos na inibição da replicação viral. Interferon tipo II: o Interferon γ produzido por linfócitos Th1 CD4 e por células NK também induzem a inibição da replicação viral, mas são potentes estimuladores de macrófagos e da apresentação de antígenos.

A racionalidade para o emprego de Interferon no tratamento da E.M, se baseou no caráter recorrente ou continuado da doença, que sugeria infecção viral no SNC e também por se atribuir significância patogênica a alguns achados que mostraram deficiente produção de IFN γ por células NK dos pacientes com E.M (NEIGHBOUR *et al.*, 1982). Nessa linha de raciocínio, PANITCH e colaboradores (1987) administraram interferon gama a pacientes com E.M, tendo como resultado o aumento das exacerbações. Em contraste, estudos feitos com o IFN β mostraram a tendência dessa citocina inibir a atividade do IFN γ e reduzir a atividade da E.M.

O advento da tecnologia do DNA recombinante no início dos anos 80 permitiu a clonagem dos genes dos interferons e seus produtos e precipitaram a pesquisa na área dos interferons. O IFN β foi clonado e expresso em bactérias no início dos anos 80 mas somente

pode ser utilizado na clínica após a inserção de um resíduo de serina no lugar de uma cisteína na posição 17, o que causou muita estabilidade a molécula. Essa preparação é conhecida como IFN β ser-17 ou Betaseron. Uma molécula glicosilada de IFN β produzido por uma linhagem de células de mamíferos, diferente do IFN recombinante também está sendo utilizado no tratamento da E.M, conhecido como IFN β 1a ou comercialmente Avonex. No emprego terapêutico, estes produtos diferem na dose, na frequência e na forma de aplicação.

Nestas duas últimas décadas, vários estudos multicêntricos foram concluídos, mostrando de uma forma geral, que a administração do IFN β (tanto 1a como 1b) tem efeito benéfico no tratamento da E.M na forma surto-remissão e mais recentemente os autores vem utilizando essa abordagem terapêutica também para as formas progressivas da doença (FREEMAN *et al.*, 2001).

O emprego de imagem por ressonância magnética, mesmo com algumas restrições que a técnica apresenta, tem auxiliado o acompanhamento do tratamento dos pacientes com E.M e em particular a imunoterapia com o IFN β . Assim, o efeito terapêutico do IFN β -1b foi confirmado pela redução da atividade da doença com diminuição de lesões verificadas por MRI (PATY *et al.*, 1993). Em estudos recentes comparando ambos os tratamentos, alguns autores mostraram que o tratamento com IFN β -1b foi mais eficaz em pacientes com E.M com base nos critérios clínicos e MRI (HARTUNG , 2001; DURELLI *et al.*, 2002).

Embora os efeitos terapêuticos do interferon beta tenham sido verificados na clínica, os mecanismos pelos quais os mesmos são conseguidos, não estão totalmente esclarecidos. Com relação à síntese de citocinas, sabe-se que o IFN β antagoniza os efeitos do IFN γ inibindo a expressão das moléculas de MHC de classe II nos monócitos, células da glia e endoteliais, assim como a apresentação do antígeno e a ativação de linfócitos T (PETEREIT *et al.*, 1997; YASUDA *et al.*, 1999). Foi descrito que o IFN β reduz a resposta proliferativa de linfócitos, em células estimuladas com mitógeno inespecífico Concanavalina A (ConA) (NORONHA *et al.*, 1993), através da inibição dos receptores de IL 2 (RUDICK *et al.*, 1993).

Estudos realizados no modelo experimental da E.M mostraram que a E.A.E também pode ser prevenida pela administração sistêmica de IFN β (RUULS *et al.*, 1996; YASUDA *et al.*, 1999). A redução da gravidade da doença, obtida pela transferência adotiva de linfócitos encefalitogênicos, também foi observada quando essas células foram previamente incubadas na presença do IFN β (RUULS & SEDGWICK, 1998). Estudos mostram, no modelo da E.A.E, que a administração de IFN beta, reduz a gravidade da doença e aumenta os níveis de TGF β (YASUDA *et al.*, 1999; GAYO *et al.*, 2000). Pesquisas indicam que o tratamento com IFN β leva a redução dos níveis de IL12, resultando na supressão de respostas Th1 (KARP *et al.*, 2000; HUSSIEN *et al.*, 2001; BYRNES *et al.*, 2002), inibição nos níveis de TNF α (CHABOT *et al.*, 2000), em contraste com aumento nos níveis de IL10 (RUULS e SEDGWICK, 1998; YASUDA *et al.*, 1999; CHABOT *et al.*, 2000).

Com relação às moléculas coestimulatórias, foi observado que a terapia tanto com IFN β -1b como IFN β -1a, reduziu o número de células B CD80+ circulantes (GENÇ *et al.*, 1997) e aumentou a expressão da molécula CD86 tanto em monócitos como em células dendríticas do sangue periférico de pacientes portadores de E.M (GENÇ *et al.*, 1997; HUSSIEN *et al.*, 2001, LIU *et al.*, 2001, HUANG *et al.*, 2001). Resultados que estamos apresentando mostram que efeito benéfico da imunoterapia com o IFN β , parece estar ligado ao aumento da expressão da molécula CTLA-4, provavelmente devido a sua função imunorreguladora (capítulo 2 – HALLAL-LONGO *et al.*, 2003)

Com relação a apoptose, estudos realizados por REP e colaboradores (1999) sugerem que o tratamento com IFN β afeta a expressão do receptor Fas (CD95) nas células T de pacientes com E.M, induzindo apoptose e a eliminação de células T auto-reativas.

O tratamento com IFN β modificou também, a migração dos linfócitos para o SNC, reduzindo de forma significativa a expressão das moléculas de adesão nas células endoteliais. Estudos realizados por RUULS e colaboradores (1996) mostraram que o tratamento com IFN β resultou em uma quase completa ausência de infiltrado de leucócitos no SNC na E.A.E, indicando que o tratamento é direta ou indiretamente responsável pela inibição da migração das células no SNC.

2- OBJETIVOS

Diante do exposto, nosso objetivo foi avaliar o efeito da imunoterapia com Interferon beta nos linfócitos circulantes periféricos respondedores aos componentes da mielina de murinos na Encefalomielite Experimental Auto-imune, analisando a expressão de moléculas coestimulatórias.

A segunda proposta do estudo foi verificar o efeito do IFN β na resposta proliferativa de linfócitos dos pacientes tratados ou não, quando estimulados por mitógenos inespecífico e neuroantígenos, assim como a expressão da molécula CTLA-4 e Fas (na superfície dos leucócitos e na forma solúvel).

3- CAPÍTULOS

CAPÍTULO 1

“COSTIMULATORY MOLECULES EXPRESSION OS LEUKOCYTES FROM MICE WITH EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE ENCEPHALONYELITIS TREATED WITH INTERFERON BETA”

Dannie E. M. Hallal, Alessandro S. Farias, Elaine C. Oliveira, Blanca M. Diaz-Bardales, Carlos Otávio Brandão, Gustavo G. Protti, Fernanda G. Pereira, Irene L. Metze and Leonilda M.B. Santos

Neuroimmunology Unit – Department of Microbiology and Immunology
University of Campinas (UNICAMP) – Campinas – SP

Costimulatory Molecule Expression on Leukocytes from Mice with Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Treated with IFN- β

DANNIE E.M. HALLAL,¹ ALESSANDRO S. FARIAS,¹ ELAINE C. OLIVEIRA,¹
BLANCA MARIA DIAZ-BARDALES,¹ CARLOS OTAVIO BRANDÃO,¹ GUSTAVO G. PROTTI,¹
FERNANDA G. PEREIRA,² IRENE L. METZE,² and LEONILDA M.B. SANTOS¹

ABSTRACT

Interferon- β (IFN- β) is of benefit in the treatment of multiple sclerosis (MS) and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), but the mechanisms by which it exerts this beneficial effect remain uncertain. The present data demonstrate that IFN- β therapy impairs the proliferative response to concanavalin A (ConA) and myelin basic protein (MBP), decreases expression of the CD80 molecule on leukocytes of treated mice, and may thereby impede the Th1 cell activation-promoting anergy in EAE. Moreover, IFN- β therapy increases expression of the CTLA4 molecule, which induces a counterregulatory Th2 response. The reduction of CD80 expression with concomitant increase of CTLA4 expression alters the course of EAE and may be useful as a monitor in therapy with IFN- β .

INTRODUCTION

INTERFERON- β (IFN- β) HAS BEEN SHOWN to reduce the frequency of clinical attacks, the activity of MRI lesions, and the evolution of the disease in patients with multiple sclerosis (MS).^(1,2) Moreover, there is evidence that IFN- β directly modulates the immune response and reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE),^(3,4) which is a demyelinating diseases of the central nervous system (CNS) that is mediated by Th1 type CD4⁺ lymphocytes and serves as a model for MS.⁽⁵⁾ The progression of MS and EAE correlates with increasing levels of proinflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor- α (TNF- α), IFN- γ , and interleukin-12 (IL-12), as well as a decrease in the levels of anti-inflammatory (Th2 type) cytokines, such as IL-10, IL-4, and transforming growth factor- β (TGF- β).⁽⁶⁾ There is also evidence of an effect of IFN- β on cytokine production. Levels of IFN- γ ,⁽⁷⁾ TNF- α ,⁽⁸⁾ and IL-12⁽⁹⁾ decreased in patients with MS during treatment with IFN- β as well as in the experimental model. On the other hand, IFN- β enhanced the production of anti-inflammatory cytokines, such as IL-10^(10,11) and TGF- β ,^(10,12) in patients with MS and in the EAE model.⁽³⁾

Two signals are needed for T cell activation. Binding of the T cell receptor by a peptide/MHC complex provides the first,

and the second is provided by cytokines such as IL-2 and costimulatory proteins such as CD80 and CD86 expressed on antigen-presenting cells (APCs).⁽¹³⁾ In the EAE model, the CD80⁺ cells activate Th1 lymphocytes, and CD86 activates the Th2 cells.⁽¹⁴⁾ Moreover, cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA4), a counterreceptor in addition to CD28 for the B7 family of costimulatory molecules, is a negative regulator of T cell activation.^(15,16)

The present study investigates whether IFN- β affects the expression of costimulatory molecules (CD28, CD80, CD86, and CTLA4), causing the consequent induction of anergy in EAE. Because the EAE model presents many clinical and histologic similarities with MS, this approach underlines the importance of studies in animal models exploring the effects of IFN- β immunotherapy.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Six-to-eight-week-old female SJL mice, which are highly susceptible to the induction of EAE,^(3,4) were obtained from The Harlan Sprague Dawley Laboratory (Indianapolis, IN). The

¹Neuroimmunology Unit—Department of Microbiology and Immunology, and ²Laboratório Marcadores Celulares, University of Campinas (UNICAMP), Campinas-SP, Brazil.

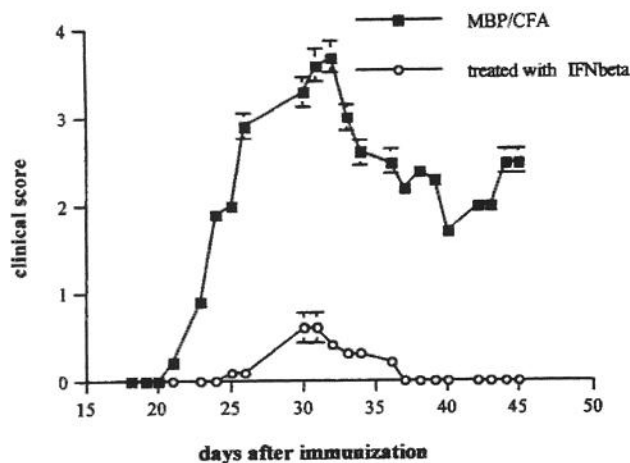


FIG. 1. Clinical scores of EAE in mice treated *in vivo* with recombinant mouse IFN- β (rMuIFN- β). Treatment with 10,000 IU/day was given on days -7, -5, and -2, followed by immunization with MBP/CFA on day 0.

animals were housed and maintained pathogen free in the university animal facility. All procedures were carried out in accordance with the guidelines proposed by the Brazilian Council on Animal Care (COBEA) and approved by the Ethical Committee on Animal Experimentation (CEE/UNICAMP).

Treatment with IFN- β

The mice were divided into two groups of 10. One group received no IFN- β treatment (controls), and the other received IFN- β (10,000 IU mouse/day, every other day, for a total of 30,000 IU on days -7, -5, and -2. On day 0, all mice were immunized with myelin basic protein (MBP)/complete Freund's adjuvant (CFA).

Antigen, antibody, and recombinant cytokines

Mouse IFN- β (Cytimmune) was purchased from Lee Biomolecular Research Inc. (San Diego, CA). Monoclonal antibodies (mAbs) anti-CD4, anti-CD8, anti-CD28, anti-CD80, anti-CD86, and anti-CTLA4, conjugated to FITC or phycoerythrin (PE) were purchased from PharMingen (San Diego, CA). MBP was purified from guinea pig spinal cords as previously described.⁽¹⁷⁾

Immunization and induction of EAE

The mice were immunized with MBP. Each animal received an injection in the flank of 400 μ g MBP in 0.10 ml phosphate-buffered saline (PBS) emulsified in an equal volume of CFA containing 4 mg/ml *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (Difco, Detroit, MI), an immunization protocol that has been previously described.⁽¹⁸⁾ Mice were evaluated daily for signs of disease and graded on the following scale: grade 1, limp tail; grade 2, hind limb weakness; grade 3, plegia of both hind limbs; grade 4, plegia of three or four limbs; grade 5, moribund.

Isolation of lymphocytes

Spleen and draining lymph node cells were minced through a steel sieve in Hank's buffer. Connective tissue fragments were allowed to settle for 10 min at 4°C, and lymphocytes were

sedimented from the supernatant by low-speed centrifugation (170g for 10 min at 4°C).

Proliferation assay

For concanavalin A (ConA) or MBP stimulation, lymphocytes were cultured in RPMI 1640 with 0.1 mM nonessential amino acids, 1 mM sodium pyruvate, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 U/ml streptomycin, 2% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), and 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). The optimal concentration of mitogens had been determined in pilot experiments establishing the dose-response pattern, involving various concentrations of ConA and MBP, with the optimums fixed at 2.5 μ g/ml for ConA and 25.0 μ g/ml for MBP. The lymphocytes (2×10^5 /well) were cultured for 48 h for ConA and 144 h for MBP stimulation. The cultures were pulsed with 1 μ Ci 3 H-thymidine (Amersham, Buckinghamshire, U.K.) per well during the last 16 h of culturing and then harvested (Cell Harvester, Cambridge Technology, Cambridge, MA). Thymidine uptake was measured in a scintillation counter (Beckman System, San Jose, CA).

Flow cytometry

Single cell suspensions (1×10^6 cells/ml) were stained using anti-CD4, anti-CD8, anti-CD28, anti-CD80, anti-CD86, and anti-CTLA4 mAbs conjugated to FITC or PE. The analysis was performed using a Becton Dickinson FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

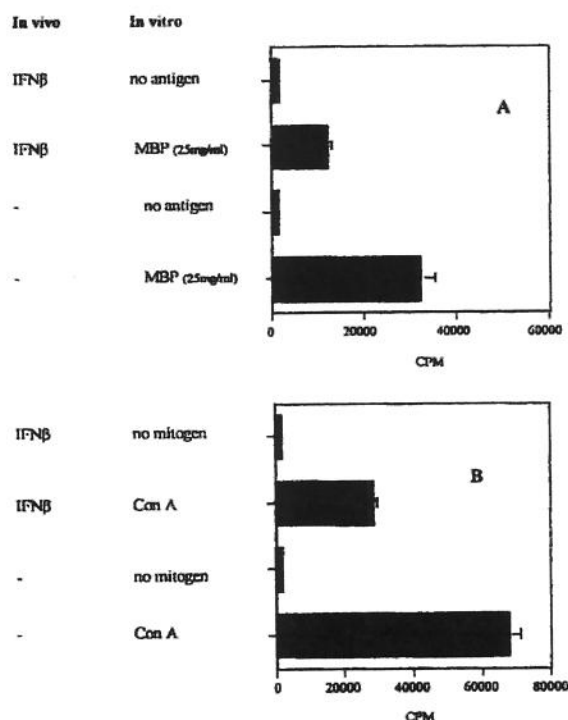


FIG. 2. Effect of IFN- β on proliferative response of lymph node cells stimulated with MBP and ConA. SJL mice treated or not with IFN- β *in vivo* were immunized, and lymph node cells were cultured and stimulated *in vitro* with MBP (A). Spleen cells from naive mice treated *in vivo* with IFN- β were stimulated *in vitro* with ConA (B).

Statistical analysis

The statistical significance of the data was determined by a Student's *t*-test and a two-tailed Wilcoxon rank sum test. A *p* value < 0.05 was considered significant.

RESULTS

Reduction of clinical signs of EAE by administration of IFN- β

To examine the effect of IFN- β on EAE, two groups of mice (10 per group) were immunized with MBP/CFA. One group was treated with 30,000 IU IFN- β /mouse in three doses, starting 7 days prior to immunization, and the other group served as the untreated control. Administration of IFN- β caused a delay in the onset of the disease and a much milder disease course (maximum clinical score: immunized group 3.8 ± 0.4 vs. 0.6 ± 0.1 for the treated group, $p < 0.001$) (Fig. 1). No significant difference in animal weight was noted between the IFN- β -treated group and the control group.

Inhibition of T cell proliferation by IFN- β

The effects of *in vivo* administration of IFN- β on the *in vitro* proliferative response to MBP of lymph nodes from MBP/CFA-

immunized mice (Fig. 2A) and of ConA-stimulated spleen cells from nonimmunized mice are shown in Figure 2B. IFN- β administration effectively inhibited the T cell response to MBP ($27,620 \pm 1,600$ cpm) for nontreated group vs. $12,640 \pm 1,200$ cpm for the treated group ($p < 0.01$) (Fig. 2A). Administration of IFN- β also reduced the proliferative response of lymphocytes from nonimmunized mice stimulated with nonspecific mitogen ConA ($61,420 \pm 2,620$ cpm and $37,840 \pm 2,400$ cpm for the nontreated and treated group, $p < 0.01$) (Fig. 2B).

Modification of expression of costimulatory molecules by *in vivo* administration of IFN- β

As IFN- β administration prior to MBP/CFA lessened the severity of EAE and suppressed the *in vitro* proliferative response, the ability of IFN- β to modify costimulatory molecule expression was examined. The *in vivo* administration of IFN- β inhibited the expression of CD80 in the treated group compared with immunized and naive groups (naive mice $6.5\% \pm 1.2\%$ vs $18\% \pm 0.8\%$ in the immunized group and $7.8\% \pm 0.6\%$ in the immunized and treated group, $p < 0.001$). There were no significant changes in the expression of CD28 ($p > 0.05$). Moreover, there was no significant change observed among the three groups in the expression of CD86 ($p > 0.05$) (Fig. 3).

The expression of CTLA4 was determined in the immunized group treated or not with IFN- β 24 h after the last dose of 10,000

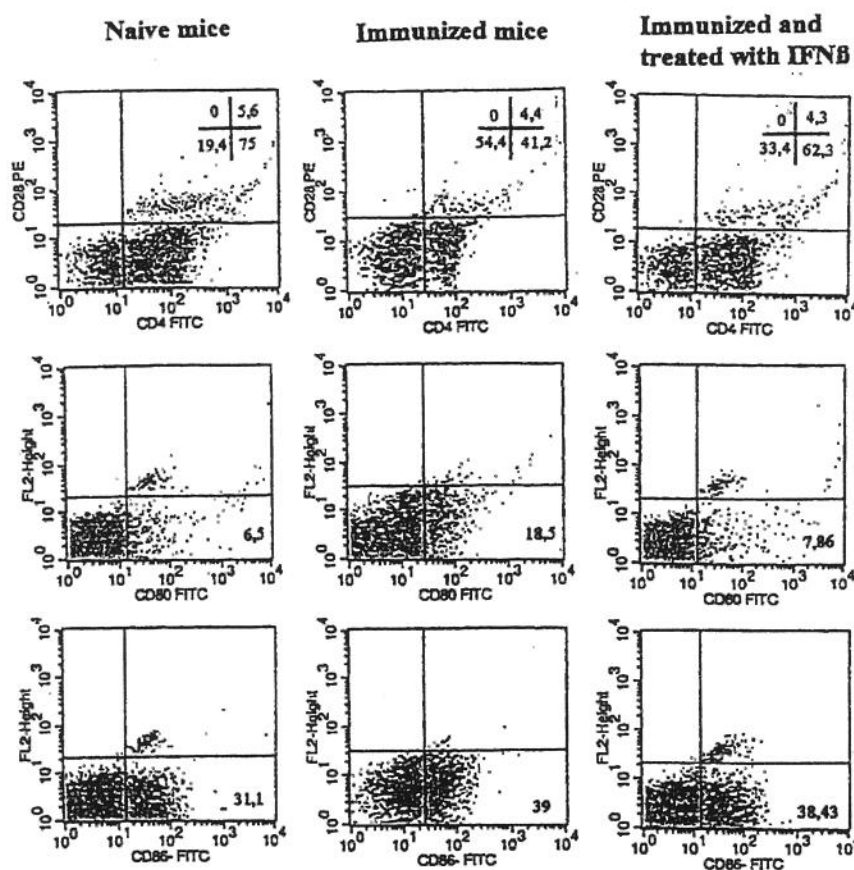


FIG. 3. Costimulatory molecule expression on leukocytes of SJL mice treated or not with IFN- β . Lymph node cells from naive mice and those treated or not with IFN- β were labeled with mAbs to CD28, CD80, and CD86, and the expression of these molecules was quantified by flow cytometry 24 h after the last treatment. The results are representative of eight experiments.

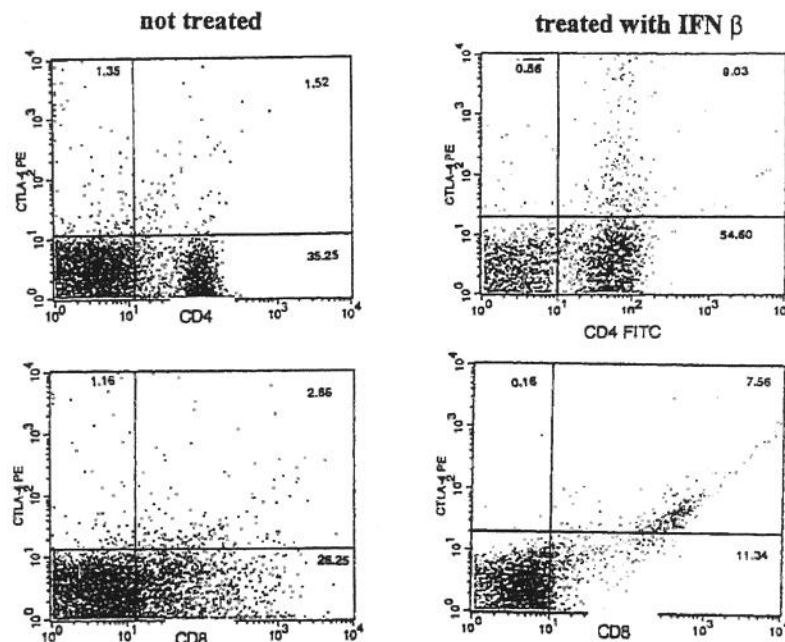


FIG. 4. CTLA4 (CD152) expression on lymphocytes from SJL mice treated or not with IFN- β . The expression of CTLA4 was quantified by flow cytometry on lymph node cells from SJL mice treated or not with IFN- β .

IU (total of 30,000 IU mouse in three doses). The results presented in Figure 4 are representative of eight experiments. The data show that the expression of CTLA4 on the surface of leukocytes increased significantly after administration of IFN- β compared with that of those of the nontreated group. This increase was observed for the expression of CTLA4 in CD4⁺ cells ($1.52\% \pm 0.2\%$ for nontreated group vs. $9.03\% \pm 0.9\%$ for the treated group, $p < 0.001$) and CD8⁺ cells ($2.6\% \pm 1.2\%$ in the nontreated group vs. $7.56\% \pm 0.7\%$ in the treated group, $p < 0.001$) (Fig. 4).

DISCUSSION

This study showed that the *in vivo* administration of IFN- β to SJL mice reduces the severity of EAE by altering the expression of costimulatory molecules on leukocytes. As demonstrated in Figure 1, administration of IFN- β markedly reduces the clinical signs of EAE when given before the onset of the disease. Treatment with IFN- β caused a stable, less severe form of the disease, whereas the control animals continued to have relapses of the acute form of the disease. These results are in agreement with previous data demonstrating the beneficial effects of IFN- β in murine EAE.^(3,4) The *in vivo* administration of IFN- β also alters the *in vitro* immune response. As demonstrated in Figure 2, administration of IFN- β inhibited the proliferative response of lymph node T cells from MBP/CFA-immunized mice and of spleen cells from nonimmunized animals stimulated with ConA. These results are also in agreement with previous observations^(3,19,20) indicating that IFN- β can provide effective immunosuppression, resulting in inhibition of the proliferative response of autoreactive T cells.

The role of costimulatory molecules in the maintenance and

loss of tolerance has been described.⁽²¹⁾ T cell clones activated solely by T cell receptor (TCR) binding to peptides and MHC molecules without efficient costimulatory stimulation become anergic.⁽¹⁹⁾ Moreover, CTLA4/CD80/86 interactions may play a role in the induction of anergy in the presence of low costimulatory molecule expression.⁽²⁰⁾

In the present study, a significant increase in the expression of CD80 molecules in mice immunized with MBP was found in relation to the normal expression of these molecules in naive animals, but with IFN- β treatment, this was reduced to normal levels. No significant changes in the expression of CD28 and CD86 were observed. The role of CD80 in the development of organ-specific autoimmune diseases, such as EAE and MS, involves expression on activated microglia,^(22,23) infiltrating macrophages, and perivascular lymphocytes in active MS brain lesions, but not in normal brains, as previously described.⁽²⁴⁾ Moreover, actively induced EAE in mice is prevented by treatment with anti-CD80, whereas treatment with anti-CD86 antibody significantly worsened both clinical and histologic disease. The ability of anti-CD80/CD86 antibodies to inhibit or enhance EAE relates to the capacities of these antibodies to activate Th1 or Th2 cell cytokine.⁽¹³⁾ The increase in anti-inflammatory cytokine *in vivo* could be responsible for the decrease in CD80 expression, as it has been shown that IFN- β enhances IL-10 and TGF- β production,^(3,9) and these cytokines decrease CD80/CD86 expression.^(23,24) IFN- β also diminishes the production of IFN- γ , which in turn induces the expression of CD80 and CD86 molecules.⁽²⁵⁾ MS patients treated with IFN- β have shown decreased CD80 expression on circulating B lymphocytes^(26,27) and increased CD86 expression on monocytes.⁽²⁷⁾ The *in vitro* addition of IFN- β upregulated the expression of CD80 and CD86 molecules in both dendritic and monocyte cells.^(28,29)

Concomitant with the reduction in CD80 molecule expression, IFN- β therapy was found to cause a moderate increase in the early expression of CTLA4 molecules. Despite various research efforts, the mechanisms by which CD28 and CTLA4 exert their effects remain poorly understood. There is some evidence that CTLA4 may function, at least in part, by competing with CD28 for CD80/86 ligands, thereby acting as an indirect attenuator of costimulatory signals, and that the competition of CTLA4 may be most effective when CD80/86 molecule levels are low.⁽³⁰⁾ The CD28 molecule is constitutively expressed on T cells, whereas CTLA4 is not readily detectable until 24–48 h after activation. The present data show that treatment with IFN- β activated the early expression of CTLA4 *in vivo*, as the cells analyzed here were not activated *in vitro*.

In recent years, various models have been proposed to explain whether CTLA4 might preexist, although expressed at low levels, or can be induced rapidly even in naive cells on engagement of the TCR and CD28.⁽³⁰⁾ This would be a possible mechanism for ensuring peripheral tolerance by preventing activation when a T cell encounters a self-antigen. The early expression of CTLA4 in T cells may also explain observations that a CTLA4 blockade accelerates the onset of experimental autoimmune diseases, including EAE.^(14–16) We have demonstrated that immunotherapy with IFN- β induces a moderate expression of CTLA4, but it is possible that even very low levels of this molecule may be sufficient to bind to the CD80 molecule, which is reduced by the treatment. MBP-specific T cell activation might then be reduced, resulting in less severe EAE.

We have demonstrated here that therapy with IFN- β markedly reduces the expression of costimulatory molecules (CD80) and increases CTLA4 expression. These observations could explain, at least in part, the reduction of T lymphocyte activation and, consequently, the beneficial effect of this treatment in EAE.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the collaboration of Linda Gentry El-Dash in the linguistic revision of the manuscript and of Gislaine C.L. Brito and Jose R. Duque Estrada in technical assistance. This work was supported by FAPESP (00/07703-7), CNPq (300735/84-87), and FAEP-UNICAMP.

REFERENCES

1. RUDICK, R.A., GOODKIN, D.E., JACOBS, L.D., HERNDON, R.M., RICHERT, J.R., SALAZAR, A.M., FISCHER, J.S., GRANGER, C.V., SIMON, J.H., ALAM, J.J., SIMONIAN, N.A., CAMPION, M.K., BARTOSZAK, D.M., BOURDETTE, D.N., BRAIMAN, J., BROWNSCHIEDLE, C.M., COATS, M.E., COHAN, S.L., DOUGHERTY, D.S., KINKEL, R.P., MASS, M.K., MUNSCHAUER, F.E., PRIORE, R.L., WITHAM, R.H., et al. (1997). Impact of interferon beta 1a on neurologic disability in relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). *Neurology* **49**, 358–363.
2. ZHAO, G.J., KOOPMANS, R.A., LI, D.K., BEDELL, L., and PATY, D.W. (2000). Effect of interferon beta 1- β in MS: assessment of annual accumulation of PD/T2 activity on MRA. UBC MS/MRI Analysis Group and the MS Study Group. *Neurology* **54**, 200–206.
3. YASUDA, C.L., AL-SABBAGH, A., OLIVEIRA, E.C., DIAZ-BARDALES, B.M., GARCIA, C.A.A.C., and SANTOS, L.M.B. (1999). Interferon beta modulates experimental autoimmune encephalomyelitis by altering the pattern of cytokine secretion. *Immunol. Invest.* **28**, 115–126.
4. RUULS, S.R., LABIE, M.C.D.C., WEBER, K.S., BOTMAN, C.A.D., GROENESTEIN, R.J., DIJKSTRA, C.D., OLSSON, T., and VAN DER MEIDE, P.H. (1996). The length of treatment determines whether IFN- β prevents or aggravates experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats. *J. Immunol.* **157**, 5721–5731.
5. WEINER, H.L., FRIEDMAN, A., MILLER, A., KHOURY, S.J., AL-SABBAGH, A., SANTOS, L.M.B., SAYEG, M., NUSSENBLATT, R.B., TRENTAN, D.E., and HAFER, D.A. (1994). Oral tolerance: immunologic mechanisms and treatment of murine and human organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 809–837.
6. OZENCI, V., KOUWENHOVEN, M., HUANG, Y.M., KIVISAKK, P., and LINK, H. (2000). Multiple sclerosis is associated with an imbalance between tumor necrosis factor- α (TNF- α) and IL-10-secreting blood cells is corrected by interferon-beta (IFN-beta) treatment. *Clin. Exp. Immunol.* **120**, 147–153.
7. PETERIT, H.F., BAMBORSCHKE, S., ESSE, A.D., and HEISS, W.D. (1997). Interferon gamma producing blood lymphocytes are decreased by interferon beta therapy in patients with multiple sclerosis. *Mult. Scler.* **3**, 180–183.
8. BROD, S.A., MARSHALL, G.D., HENNINGER, E.M., SRIRAM, S., KHAN, M., and WOLINSKY, J.S. (1996). Interferon beta 1b treatment decreases tumor necrosis factor α and increases interleukin 6 production in multiple sclerosis. *Neurology* **46**, 1633–1638.
9. BYSKOSH, P.V., and REDER, A.T. (1996). Interferon beta 1b effects on cytokine mRNA in peripheral mononuclear cells in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis* **1**, 262–269.
10. GAYO, A., MOZO, L., SUAREZ, A., TUNON, A., LAHOZ, C., and GUTIERREZ, C. (2000). Long-term effect of IFN- β 1b treatment on the spontaneous and induced expression of IL-10 and TGF- β 1 in MS patients. *J. Neurol. Sci.* **179**, 43–49.
11. CHABOT, S., and YONG, V.W. (2000). Interferon beta 1b increases interleukin 10 in a model of T cell-microglia interaction. *Relevance to MS. Neurology* **55**, 1497–1505.
12. NICOLETTI, F., DI MARCO, R., PATTI, F., REGGIO, E., NICOLETTI, A., ZACCONE, P., STIVALA, F., MERONI, P.L., and REGGIO, A. (1998). Blood levels of transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) are elevated in both relapsing remitting and chronic progressive multiple sclerosis (MS) patients and are further augmented by treatment with interferon beta (IFN- β 1b). *Clin. Exp. Immunol.* **113**, 96–99.
13. LENSCHOW, D.J., WALUNAS, T.L., and BLUESTONE, J.A. (1996). CD28-B7 system of T cell costimulation. *Annu. Rev. Immunol.* **14**, 233–258.
14. KUCHROO, V.K., DAS, M.P., BROWN, J.A., RANGER, A.M., ZAMVIL, S.S., SOBEL, R.A., WEINER, H.L., NABAVI, N., and GLIMCHER, L.H. (1995). B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell* **80**, 707–718.
15. PERRIN, P.J., SCOTT, D., QUIGLEY, L., ALBERT, P.S., FEDER, O., GRAY, G.S., ABE, R., JUNE, C.H., and RACKE, M.K. (1995). Role of B7:CD28/CTLA4 in the induction of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis. *J. Immunol.* **154**, 1481–1490.
16. MILLER, S.D., VANDERLUGT, C.L., LENSCHOW, D.J., POPE, J.G., KARANDIKAR, N.J., DAL CANTO, M.C., and BLUESTONE, J.A. (1995). Blockade of CD80/B71 interaction prevents

- epitope spreading and clinical relapses of murine EAE. *Immunity* 3, 739–745.
17. DEIBLER, G.E., MARTENSON, R.E., and KIES, M.W. (1972). Large-scale preparation of myelin basic protein from central nervous tissue of several mammalian species. *Prep. Biochem.* 2, 139–165.
 18. RACKE, M.K., BONOMO, A., SCOTT, D.E., CANNELLA, B., LEVINE, A., RAINE, C.S., SHEVACH, E.M., and ROCKEN, M. (1994). Cytokine-induced immune deviation as a therapy for inflammatory autoimmune disease. *J. Exp. Med.* 180, 1961–1966.
 19. NORONHA, A., TOSCAS, A., and JENSEN, M.A. (1993). Interferon beta decreases T cell activation and interferon γ production in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 46, 145–153.
 20. RUDICK, R.A., CARPENTER, C.S., COOKFAIR, D.L., TUOHY, V.K., and RANSOHOFF, R.M. (1993). *In vitro* and *in vivo* inhibition of mitogen-driven T-cell activation by recombinant interferon beta. *Neurology* 43, 2080–2087.
 21. CHAMBERS, C.A., KUHNS, M.S., EGEN, J.G., and ALLISON, J.P. (2001). CTLA4 mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 565–694.
 22. PEREZ, V.L., VAN PARIJS, L., BIUCKIANS, A., ZHENG, X.X., STROM, T.B., and ABBAS, A.K. (1997). Induction of peripheral T cell tolerance *in vivo* requires CTLA4 engagement. *Immunity* 6, 411–417.
 23. DE SIMONE, R., GIAMPAOLO, A., GIOMETTO, B., GALLO, P., LEVI, G., PESCHLE, C., and ALOISI, F. (1995). The costimulatory molecule B7 is expressed on human microglia in culture and in multiple sclerosis acute lesions. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 54, 175–187.
 24. WILLIAM, K., ULVESTAD, E., and ANTEL, J.P. (1994). B7/BB-1 antigen expression on adult human microglia studied *in vitro* and *in situ*. *Eur. J. Immunol.* 24, 3031–3037.
 25. DING, L., LINSLEY, P.S., HUANG, L.-Y., GERMAIN, R.N., and SHEVACH, E.M. (1993). IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. *J. Immunol.* 151, 1224–1234.
 26. GENÇ, K., DONA, D.L., and REDER, A.T. (1997). Increased CD80⁺ B cells in active multiple sclerosis and reversal by interferon- β 1b therapy. *J. Clin. Invest.* 99, 2664–2671.
 27. LIU, Z., PELFREY, C.M., COTLEUR, A., LEE, J.-C., and RUDICK, R.A. (2001). Immunomodulatory effects of interferon beta-1a in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 112, 153–162.
 28. HUANG, Y.-M., HUSSEIN, Y., JIN, Y.-P., SODERSTROM, M., and LINK, H. (2001). Multiple sclerosis: deficient *in vitro* responses of blood mononuclear cells to IFN- β . *Acta Neurol. Scand.* 104, 249–256.
 29. HUANG, Y.-M., STOYANOVA, N., JIN, Y.-P., TELESHOVA, Y., HUSSEIN, Y., XIAO, B.-G., FREDRIKSON, S., and LINK, H. (2001). Altered phenotype and function of blood dendritic cells in multiple sclerosis are modulated by IFN- β and IL-10. *Clin. Exp. Immunol.* 124, 306–314.
 30. CARRERO, B.M., BENNETT, F., CHAU, T.A., LING, V., LUXENBERG, D., JUSSIF, J., BAROJA, M.L., and MADRENAS, J. (2000). CTLA4 (CD152) can inhibit T cell activation by two different mechanisms depending on its level of cell surface expression. *J. Immunol.* 165, 1352–1356.

Address reprint requests or correspondence to:

Dr. Leonilda M.B. Santos
 Departamento de Microbiologia e Imunologia
 Instituto de Biologia
 UNICAMP
 Campinas-SP
 Brazil CEP 13083-970
 Tel: 55 19 3788-6262
 Fax: 55 19 3788-8190
 E-mail: leonilda@unicamp.br

Received 30 December 2002/Accepted 25 March 2003

CAPÍTULO 2

“DIMINISHED MYELIN-SPECIFIC T CELL ACTIVATION ASSOCIATED WITH INCREASE IN CTLA4 AND FAS MOLECULES IN MULTIPLE SCLEROSIS PATIENTS TREATED WITH INTERFERON BETA”

Dannie E.M. Hallal-Longo, Sandra R. Mirandola, Elaine C. Oliveira, Carlos O. Brandão, Fernanda G. Pereira, Irene L. Metze, Benito P. Damasceno and Leonilda M.B. Santos

Neuroimmunology Unit – Department of Microbiology and Immunology
University of Campinas (UNICAMP) – Campinas – SP

Diminished myelin-specific T cell activation associated with increase in CTLA4 and Fas molecules in Multiple sclerosis patients treated with Interferon beta

Dannie E. M. Hallal-Longo¹, Sandra R. Mirandola¹, Elaine C. Oliveira¹, Alessandro S. Farias¹, Fernanda G. Pereira¹, Carlos Otavio Brandão¹, Benito P. Damasceno² and Leonilda M.B. Santos¹

From the Neuroimmunology-Unit 1-Department of Microbiology and Immunology 2-
Department of Neurology- Medical School - University of Campinas – UNICAMP –
Campinas- SP-Brazil

Key words: costimulatory molecules, Fas molecule, Myelin Basic Protein

Running title: *Changes in the immune response in relapsing and remitting MS treated with Interferon beta*

Address for correspondence: Leonilda M.B. Santos Ph.D. – Departamento de Microbiologia e Imunologia – Instituto de Biologia- UNICAMP- Campinas – SP- Brazil- CEP 13083-970 – FAX # 55.19. 37886276 E mail: leonilda@unicamp.br

ABSTRACT

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory disease of the white matter of the central nervous system characterized by focal areas of demyelination. Interferon- β (IFN β) provides an effective treatment which lessens the frequency and severity of exacerbations in relapsing-remitting multiple sclerosis, but the mechanisms by which IFN β is efficient remain uncertain. These data demonstrate that IFN β impairs the proliferative response to myelin basic protein (MBP) and myelin, as well as increasing the expression of the CTLA4 intracellular molecule. Moreover, this treatment increases the expression of surface Fas molecules as well as of the soluble form of these molecules. Our hypothesis is that the increase in Fas and CTLA4 molecules in MS patients may lead to leukocyte apoptosis, which suggests possible mechanisms underlying the therapeutic response to IFN β .

INTRODUCTION

Treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis (MS) with IFN β reduces the frequency and severity of clinical exacerbations and has a beneficial effect on the progression of the disease¹. The pathogenesis of MS assumes that autoreactive T-lymphocytes and monocytes, after crossing the blood-brain barrier, produce central nervous system (CNS) demyelination.² Therefore, regulation through the induction of anergy or the elimination of autoreactive T-cells may be a possibility for preventing MS lesions.

Two signals are needed for T cell activation. The binding of the T cell receptor to a peptide-MHC complex provides the first, while the second is provided by cytokines such as IL2 and costimulatory proteins such as CD80 and CD86 expressed on antigen-presenting cells or CD28 and CTLA4 molecules expressed on lymphocytes; without efficient costimulatory stimulation the lymphocytes become anergic.^{3,4}

Apoptosis is a common physiological process which plays a critical role in the elimination of auto reactive T cells and, thus, immune regulation. Apoptosis of the cells which express the Fas (also known as CD95 or APO 1) molecules, results from the crosslinking of the Fas molecule with the Fas ligand.⁵⁻⁷ Mice strains carrying mutations in the Fas (*lpr*) and FasL (*gld*) genes exhibit abnormal lymphocyte proliferation and autoimmune syndromes.⁸⁻⁹ Cell death in MS, as well as in its animal model, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), has been demonstrated to be an essential mechanism in the regulation of the inflammatory reaction, and infiltrating autoreactive lymphocytes seem to be eliminated *in situ* through the apoptotic process.¹⁰⁻¹⁵ The

involvement of the Fas system in MS and in other neurological disorders has recently been reported, and it may have a role in the modulation of apoptosis.¹⁰

In the present study, the association between the activation of myelin-specific T lymphocytes in MS patients, treated or not with IFN β , was investigated, as well as the expression of CTLA4 and Fas molecules in these individuals.

MATERIALS AND METHODS

Patients: The patients in this study were identified using the criteria of Poser et al.¹⁶ to define MS. A total of 47 patients with stable MS, 55 patients in treatment with IFN β 1b and 30 normal subjects were studied; these individuals had a mean age of 31. None of the patients in any of the groups had received corticosteroids or other immunosuppressive drugs during a period of at least 6 months prior to donating blood for the study. The patients in the treated group had been receiving IFN β treatment for 6-24 months. This study was approved by the Ethics Committee of the Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP and the volunteers gave written informed consent for participation in the study.

Treatment with IFN β : Patients in the IFN β treatment group received a 20.000 UI injection of IFN β -1b every other day.

Human Myelin basic protein: Human myelin basic protein (MBP) was obtained according to Deibler et al. 1972.¹⁷

Isolation of human myelin. Humans brains were removed from patients who died from non-neurologic causes with removal occurring an averaged of 2 h after death. The white matter was removed and myelin was isolated by overlaying the homogenate in isotonic (0.32M) sucrose on a denser sucrose (0.85 M) gradient allowing the myelin to migrate down to the interface.^{18,19} The myelin was then isolated by centrifugation and pooled, dialysed against water at 4°C and lyophilized.

Purification of Mononuclear Cells: Blood samples (15 ml) were collected under sterile conditions. The cells were separated on a Ficoll-Hypaque gradient (1.077 density), and the cell concentration adjusted to 2×10^6 cells/ml

Quantification of Surface Fas and CTLA4 molecules: Five microliters of biotin anti-Fas antibody or anti-CTLA4 molecules, as well as the isotype controls (PharMingen, San Diego, CA) were added to the cells (5×10^6 cells/ml). After 40 min of incubation on ice and two washes with Hank's balanced salt solution (HBSS), avidin-FITC antibody (5 μ g/ml) were added. After 40 more min. of incubation and further washing, the presence of the Fas or CTLA4 molecules was determined by flow cytometry.

Quantification of Surface Fas molecules on CD4⁺ and CD8⁺ Cells: Ten microliters of anti-Fas antibodies conjugated with FITC (PharMingen, San Diego, CA) and 10 μ l of anti-CD4 and/or anti-CD8 antibodies conjugated with PE (PharMingen, San Diego, CA) were added to the cells (2×10^6 cell/ml). After 40 minutes of incubation and appropriate washes, the percentage of Fas molecules was determined using a Becton Dickinson FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA).

Quantification of Soluble Fas molecules: To measure the levels of soluble Fas molecules (sFas) in sera, an ELISA kit with specific monoclonal antibodies was utilized (Opteia-Human Fas kit-PharMingen). Briefly, a monoclonal antibody specific for human Fas was coated on a 96-well plate. Standards and samples were added to the wells, so that any sFas present would bind to the immobilized antibody. The wells were washed, and a mixture of biotinylated anti-human Fas antibody with horseradish peroxidase-conjugated streptavidin were added, producing an antibody-antigen *sandwich*. The wells were again washed and a substrate solution, which produces a blue color with intensity in direct proportion to the

amount of sFas present in the initial sample was added. A stop solution was then used to change the color from blue to yellow, and the wells were read at 450 nm.

Proliferation assay: Peripheral Mononuclear blood cells were purified using a Ficoll – Hypaque gradient. The cells were suspended in Hank's balanced salt solution, washed before the addition of RPMI 1640 medium supplemented with 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, penicillin-streptomycin, 12,5 mM HEPES buffer (pH=7.4), 0.2% NaHCO_3 and 10% AB⁺ human serum. The cells were cultured in 96 well flat-bottom culture plates, 10^5 per well, in the presence of 25 µg/ml of MBP or 10 µg/ml of human myelin, as well as that of PHA (5 µg/ml). Cells were incubated for 72 h for the nonspecific mitogen, and for 144 h for the antigen in a humidified, 5% CO_2 atmosphere at 37°C; the plates were pulsed with 1.0 µCi of ^3H Thymidine per well and harvested 18 hours later with a cell harvester (Cambridge Tech. MA, USA). The incorporation of ^3H Thymidine was assessed by standard liquid scintillation techniques. The results were expressed as stimulation index (SI) which is the mean counts per minute (cpm) of stimulated cells / cpm of unstimulated cells..

Cytometric Analysis of intracellular CTLA molecules. Lymphocytes (10^6 cells/ml) were stimulated with 2.5 µg/ml PHA for 20 h., the last 4 h in the presence of 12.4 µg/ml monensin. After stimulation cells were washed twice with Hank's solution (pH=7.2), fixed 15 min with formaldehyde (2% in PBS, pH7.2), permeabilized with PBS (pH 7.2), containing 0.5%BSA and 0.5% saponin, and then incubated for 15 min at room temperature with the specific mAb to CTLA4 molecule. Cells were then washed and analyzed on a Becton Dickinson FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA).

Statistical analysis: The statistical significance of the results was determined by a Wilcoxon, a Kruskal Wallis test and Spearman Rank correlation test. A p value smaller than 0.05 was considered to be significant.

RESULTS

Proliferative response. The proliferative response to PHA was evaluated for the three groups (untreated MS, treated MS and healthy donors) and the results, expressed as stimulation index (SI), are shown in Figure 1A. The healthy donor group (n=44) demonstrated an extensive proliferative response to PHA ($SI=84.4\pm89$), which was not significantly different from that of the untreated patients ($SI=91\pm85$ cpm) (n=36), or for the healthy individuals (n=27) ($SI=96\pm48$).

The lymphocyte proliferative response to myelin was evaluated for the three groups. The results shown in Figure 1-B demonstrate that the lymphocyte blastogenic response increased significantly ($p=0.003$) for the untreated MS patients ($SI=8.2\pm11$) (n=30) in relation to that of the healthy individuals ($SI=1.3\pm0.4$) (n=20). There was no significant difference ($p>0.05$) between the treated patients ($SI=1.5\pm1.0$) (n=39) and the healthy individuals ($SI=1.3\pm0.49$) (n=22).

The lymphocyte proliferative response to MBP was also evaluated. The results in Figure 1C show a significantly higher response ($p=0.007$) level for the untreated MS patients ($SI=6.6\pm4.1$) (n=28) than for the healthy group ($SI=1.6\pm0.9$) (n=22). There was no significant difference ($p>0.05$) between the treated patient group ($SI=4.3\pm1.2$) (n=44) and the healthy group ($SI=1.6\pm0.9$) (n=22).

Quantification of CTLA4 molecules.

The presence of CTLA4 molecules was quantified either in the lymphocyte surface and intracellular, by flow cytometry in the two groups of MS patients, both untreated and those treated with IFN β , as well as in the healthy donor controls. When analyzed in surface in *ex vivo* lymphocyte, or even after 24 h in culture (data not shown) no significant changes was observed in the expression of CTLA4 molecules in the three groups ($1.7\pm0.8\%$; $0.5\pm0.2\%$; $1.4\pm0.6\%$) treated, untreated patients and healthy controls. Significant changes however, was observed in the intracellular CTLA4 molecules. The mean expression of CTLA4 intracellular molecules was $15.8\pm2.1\%$ for treated MS patients (n=19), versus $3.4\pm0.7\%$ for healthy controls (n=15), revealing a significant difference between the two groups ($p=0.0001$). This expression for the untreated patients was statistically equivalent to that for the healthy subjects (n=9) ($6.2\pm1.6\%$ and $3.4\pm0.7\%$, respectively) ($p>0.05$) (Figure 2) .

Association between lymphocytes proliferative response to myelin antigens (myelin and MBP) and the expression of intracellular CTLA4 molecules.

Since CTLA4 molecules is known to inhibit the activation of T lymphocytes, the increase of these molecules was associated with lymphocyte proliferative response to myelin antigens. The results showed that there are negative correlation between intracellular CTLA4 molecules and the lymphocyte proliferative response to myelin (R square = -0,57775 $p=0,00757$) and MBP (R square = -0,5215 $p=0,0230$) for IFN β treated patients. No correlation between untreated patients or healthy controls was observed. The lymphocyte proliferative response was presented as Δ cpm which is the mean counts per minute (cpm) of stimulated cells minus cpm of unstimulated cells. (Figure3).

Quantification of Surface Fas molecule

The surface expression of Fas molecule was studied in 8 MS patients, both before IFN β therapy, and for 6 months after its initiation. A significantly greater expression of Fas surface molecules ($p=0.001$) was observed after 6 months of treatment (an increase from 8.5 ± 1.6 % to 26.8 ± 1.5 %) (Figure 4).

Quantification of Surface Fas on CD4+ and CD8+ Cells

Since CD4 T lymphocytes seem to be involved in the genesis of MS lesions, the expression of surface Fas molecule was determined by two color flow cytometry. The results showed that there are no significant differences in relation to CD4⁺Fas⁺ for the three groups: $20.5 \pm 0.9\%$, $22.5 \pm 1.2\%$, and 22.2 ± 0.8 % for healthy individuals ($n=17$), and those treated ($n=27$) and untreated MS ($n=16$) individuals, respectively (Figure 5A). Similar results were obtained for CD8⁺Fas⁺, with $11.7 \pm 1.0\%$, $12.6 \pm 1.2\%$, and $13.6 \pm 2\%$ for healthy individuals ($n=16$), and those treated ($n=26$) and untreated MS ($n=15$) (Figure 5B).

Quantification of Soluble Fas in sera

The administration of IFN β resulted in the presence of significantly more ($p=0.001$) soluble Fas molecules in treated MS patients (227.8 ± 18.4 pg/ml) ($n=38$) and untreated ones (180.1 ± 14.0 pg/ml) ($n=37$) observed when compared to healthy donors (114.4 ± 10.3 pg/ml) ($n=18$) (Figure 6).

DISCUSSION

In the present study, the T cell response to nonspecific mitogen and myelin antigens was investigated, as well as the expression of CTLA4 and Fas molecules in the peripheral blood cells of patients with MS, whether or not being treated with IFN β .

The *in vitro* proliferative response is one of the most reliable tests for assessment of the immunocompetence of T lymphocytes. In this study, we have shown, that untreated patients evidence a greater lymphocyte proliferative response to myelin and MPB than did the normal healthy controls. These results match the findings of others that demonstrated the presence of activated T cells specifically recognizing myelin antigen in the peripheral blood cells in MS patients, although the antigenic target was confined to the CNS.²⁰⁻²² These data suggest that the immune mechanism that maintains the autoreactive lymphocytes under control is impaired in MS patients. Thus, approaches such as immunotherapy with IFN β , which downregulate the activation of T cells, is useful to minimize the damage of autoreactive reactions. We were able to show that the proliferative response to myelin antigens were significantly reduced in the group of MS patients treated with IFN β . These results are in agreement with those previously described^{23,24}

The mechanisms by which the IFN β limits the expansion of myelin reactive T cells however, is not yet clear. One possibility, which has been suggested is that IFN β has an antagonizing effect on IFN γ - mediated activities, such as the reduction of the expression of MHC class II molecules on various cell types.²⁵ This

would lead to a reduced capacity of antigen-presenting cells to interact with primed T cells. Another possibility would be the induction of apoptosis in the T cells²⁶ or the modification of the expression of costimulatory molecules.

The T cell activation depend on the expression of the costimulatory molecules on antigen-presenting cells, as well as in the T lymphocytes. These proteins control the immune response through their capacity to positively or negatively influence the activation of the T lymphocytes by the stimulation of their T cell antigen receptor. The CD80 and CD86 molecules locate on the APC, each binds to one of the receptors on the T lymphocytes, either CD28 or CTLA4. These CD28 and CTLA4 proteins share amino acid sequences, but appear to serve different functions: crosslinking with the CD28 receptor enhances T cell activation, whereas that with the CTLA4 receptor inhibits it.^{4,27-30}

The importance of the CTLA4 molecule in demyelination has already been demonstrated in the EAE model. Blocking of the CTLA4 accelerates the onset of EAE, and is associated with an increased frequency in inflammatory lesions in the CNS, enhanced secretion of pro-inflammatory cytokines, and increased proliferative responses to in vitro antigen stimulation.³¹⁻³³ In the present study, the number of intracellular CTLA4 molecules increased in MS patients treated with IFN β . This increase was correlated with a decrease in the proliferative response of the T cells to myelin antigens. The intracellular portion of the CTLA4 tends to be highly conserved for various species, which suggest that the control of intracellular trafficking is important of its function. This importance is emphasize by the fact that the intracellular CTLA4 molecule is polarized toward those sites facing T cell contact.^{29,34,35} We were not able to demonstrate the expression of such molecules on

the surface of *ex vivo* lymphocytes, not even after 24 hours, in culture; probably a longer exposure to the antigen or mitogen in culture might have resulted in such expression. Since CTLA4 is known to inhibit the activation of T lymphocytes, the inhibition of autoreactive T cells may be, at least in part, responsible for the beneficial effects of IFN β treatment.

Despite considerable efforts, the mechanism by which CTLA-4 molecules exert their effects suppressive effect on T activation remain poorly understood. The CTLA-4 molecules may function at least in part by competing with CD28 for CD80/86 ligands, thus serving as an indirect attenuator of costimulatory signals. The crosslinking of CTLA4 molecules may inhibit IL2 production and consequent T cell activation³⁶ and there is also the possibility that an indirect mode of action of CTLA4, as its engagement costimulates the secretion of inhibitory cytokines, such as TGF β ³⁷. Moreover, CTLA4 , crosslinking may induce T cells apoptosis³⁸ since, it has been demonstrated that CTLA4 crosslinking on the surface of prestimulated murine T lymphocytes leads to the death of those T lymphocytes.³⁹

There are considerable evidences that apoptosis of the myelin autoreactive T lymphocytes, is deregulated in MS patients. It has been previously demonstrated that the activation-induced cell death which is triggered by the Fas receptor is impaired in MS patients.^{40,41} Moreover, recently it has been demonstrated that the IFN β treatment reduces the expression of the inhibitors of apoptosis⁴² and increase the apoptosis levels of T lymphocytes of MS patients.²⁶

In the present study, it was not tested a direct association between the increased expression of CTLA4 molecules and apoptosis, although an increase in the

expression of intracellular CTLA4 molecules was linked to simultaneous increase in Fas molecules both in the cell surface and in soluble form after treatment with IFN β .

The Fas system has been being involved in activation-induced cell death (AICD) and after activation Fas molecules are constitutively expressed in large numbers amounts on T and B lymphocytes.^{43,44} Fas molecules also occur in a soluble form (sFas), which lacks a transmembrane region and is present in normal human sera⁴⁵. As has been shown here, untreated MS patients show less Fas molecule expression than those treated with IFN β immunotherapy. The expression of Fas molecules on CD4 lymphocytes may be linked to the apoptosis of these cells, which may be involved in the development of MS. Thus, the absence or decrease in the expression of the Fas molecule may be indicative of the worsening of the disease. The results obtained here did not show a significant increase in the expression of Fas molecules on the surface of CD4 T lymphocytes, in relation to untreated or normal control groups. The increase in the expression of surface Fas molecule could be explained by the expression of these molecules on other leukocytes after the treatment with IFN β . The participation of other leukocytes must be considered in the demyelination process. The role of B cells in demyelinating disease and their fate in the central nervous system (CNS) are unknown, although there is increasing evidence that antibodies against myelin and axonal antigen play a pathogenic role in MS⁴⁶. Furthermore, B cells have been reported to be eliminated from CNS by apoptosis during spontaneous recovery from the disease.⁴⁷ Hence, it is possible that the increase in surface Fas observed in the treated MS group is related to their presence on other leukocytes, such as B cells, rather than, or in addition to T lymphocytes, and the apoptosis of these cells also contributes to the clinical recovery of the patients.

The present study also demonstrated a significant increase in the soluble form of Fas in the serum of treated MS patients as found in other studies. Our data agrees with the previous findings which suggest that IFN β affects Fas receptor expression on T cells of patients with MS, which could induce apoptosis, thus eliminating the autoreactive T cells⁴⁸. The results obtained here could be a reflection of this, but it may be the case that in some way the presence of the soluble form of the Fas may prevent cells from undergoing Fas-induced apoptosis⁴⁹ and play a role in modulating the process.

Taken together, the results presented here provide evidence of the complexity of the mechanisms that control T cell activation of MS patients. IFN β treatment reduces the proliferative response of lymphocytes to myelin antigens and induces the expression of intracellular CTLA-4 molecules and surface Fas molecule on leukocytes as well. This increase in surface Fas molecules should be favorable to the induction of apoptosis; although soluble Fas molecules released during the treatment may result in the survival of some of the T cells. Thus, the beneficial effects of IFN β treatment i.e., the reduction of myelin-specific T cell activation and the reduction in clinical signs, may thus be the result of the fact that the mechanisms of apoptosis have prevailed, thus reducing the inflammatory response despite the presence of the soluble Fas.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to acknowledge the financial support by FAPESP grant # 0/07703-7; CNPq 300375/84-87 and FAEP-UNICAMP. They also acknowledge the collaboration of Linda Gentry El-Dash in the linguistic revision of the manuscript and would like to thank Gislaïne C.L. Brito in technical assistance

REFERENCES

1. Paty, D.W., Li, D.K. Interferon beta-1b is effective in relapsing–remitting multiple sclerosis. II. MRI analysis of results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo controlled trial (UBC MS/MRI Study Group and the IFN beta Multiple Sclerosis Study Group) *Neurology* 43:662-667, 1993.
2. Antel, J. Multiple sclerosis: emerging concepts of disease pathogenesis. *J.Neuroimmunol.* 98: 45-48,1999
3. Lenschow, D.J., Walunas, T.L., Bluestone, J.A. CD28-B7 system of T cell costimulation. *Annu.Rev.Immunol.* 14:233-58, 1996
4. Chambers, C.A., Kuhns, M.S., Egen, J.G., and Allison, J.P. CTLA-4-mediated inhibition on the regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. *Ann.Rev. Immunol.* 19:561-594, 2001
5. Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y., Nagata, S. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell.* 66: 233-243, 1991.
6. Oehm, A., Behrmann, I., Falk, W., Pawlita, M., Maier, G., Klas,C., Li-Weber, M., Richards, S., Dhein, J., Trauth, D.C. Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the Tumor Necrosis Factor/Nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. *J. Biol.Chem.* 267:10709-10715, 1992.
7. Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P., Nagata, S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the Tumor Necrosis Factor family. *Cell.* 75: 1169- 1178, 1993
8. Russell, J.H., Rush, B., Weaver, C., Wang, R. Mature T cells of autoimmune *lpr-lpr* mice have a defect in antigen stimulated suicide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 4409-4413, 1993.
9. Russell, J.H. & Wang R Autoimmune *gld* mutation uncouples suicide and cytokine/proliferation pathways in activated, mature T cells. *Eur. J. Immunol.* 23:2379-2382, 1993

10. Pelfrey, C.M., Tranquill, L.R., Boehme, S.A., Mcfarland, H.F. Lenardo, MJ. Two mechanisms of antigen-specific apoptosis of Myelin Basic Protein (MBP)-specific T lymphocytes derived from Multiple Sclerosis patients and normal individuals. *J.Immunol.* 154:6191-6202, 1995
11. Dowling, P., Shang, G., Raval, S. Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) Receptor /Ligand System in multiple sclerosis brain. *J. Exp.Med.* 184:1513-1518, 1996.
12. Bauer, J.M., Bradl, W.F., Hickey, S., Forss-Petter, H., Breitschopf, C., Linington, H. Wekerle, And H. Lassmann. T cell apoptosis in inflammatory brain lesions. destruction of T cells does not depend on antigen recognition. *Am. J. Pathol.* 153: 715-724, 1998.
13. Mc Combe, P. A., Nickson, I., Tabi, Z., Pender, M.P. Apoptosis of V β 8.2 T lymphocytes in the spinal cord during recovery from Experimental Autoimmune Encephalomyelitis induced in Lewis rat by inoculation with myelin basic protein. *J. Neurol. Sci* 139: 1-6, 1996.
14. Macchi B., Matteucci C., Nocentini U., Caltagirone C., Mastino A. Impaired apoptosis in mitogen-stimulated lymphocytes of patients with multiple sclerosis. *NeuroReport* 10: 399-402, 1999
15. Semra Y.K., Seidi O.A., and Sharief M.K., Disease activity in multiple sclerosis correlates with T lymphocyte expression of the inhibitor of apoptosis proteins. *J. Neuroimmunol.* 122: 159-166, 2002
16. Poser, C.M., Paty, D.W., Scheinberg, L. et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines for research protocols. *Ann. Neurol.* 13:227-231, 1983.
17. Deibler, G.E., Martenson, R.E., Kies, M.W. Large scale preparation of myelin basic protein from central nervous tissue of several mammalian species. *Prep. Bioch.* 2: 139-165, 1972.
18. Norton W.T. and Cammer W. Isolation and characterization of myelin. In:Myelin-second edition. Edited by Pierre Morell, Plenum Press, New York, 1984
19. Norton, W.T., and Poduslo, S.E. Myelination in rat brain: Method of myelin isolation. *J. Neurochem.* 21:749-757, 1973
20. Ota K, Matsui M, Milford EL et al. T cell recognition of an immunodominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis. *Nature* 1990; **346**,183-87.

21. Hafler D.A. and Weiner HL MS: a CNS and systemic autoimmune disease. *Immunology Today* 10:104-107,1989.
23. Noronha, A., Toscas, A., Jensen, M.A. Interferon Beta decreases T cell activation and interferon gamma production in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 46:145-154, 1993
24. Rudick, R.A., Carpenter, C.S., Cookfair, D.L., Tuohy V.K., Ransohoff, R.M. In Vitro and in vivo inhibition of mitogen-driven T-cell activation by recombinant interferon beta. *Neurology* 43: 2080-2087, 1993.
25. Joseph J, Knobler RL, D'Imperio, C. Lublin F.D. Down-regulation of interferon γ -induced class II expression on human glioma cells by recombinant interferon β effects of dosage treatment schedule. *J. Neuroimmunol.* 20:39-44,1988
26. Gniadek P, Aktas, O., Wandinger K-P, Bellmann-Strobl J, Wengert Ol, Weber A, von Wussow P., Obert H-J, Zipp F. Systemic IFN β treatment induces apoptosis of peripheral immune cells in MS patients. *J Neuroimmunol.* 137:187-196, 2003
27. Walunas, T.L., Lenschow, D.J., Bakker, C.Y., Linsley, P.S., Freeman, G.J., Green, J.M., Thompson, C.B., Bluestone J.A. CTLA4 can function as negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1:405-413, 1994
28. Perez, V.L., Van Parijs, L., Biuckians, A., Zheng, X.X., Strom T.B., Abbas, A.K. Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA4 engagement. *Immunity* 6: 411-417, 1997
29. Linsley PS, Bradshaw J, Greene J, Peach R, Bennet KL, Mittler RS., Intracellular trafficking of CTLA4 and focal localization towards sites of TCR engagement. *Immunity* 4:535-543, 1995
30. Barrat FJ, Le Deist F, Benkerrou M, Bousso P, Feldmann J, Fischer A, De Saint Basile G Defective CTLA-4 cycling pathway in Chediak-Higashi syndrome: a possible mechanism for deregulation of T lymphocyte activation. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 96:8645-8650, 1999
31. Perrinn, P.J., Maldonado, J.H., Davis, T.A., June, C.H., Racke, M.K., CTLA4 Blockade enhances clinical disease and cytokine production during Experimental Allergic Encephalomyelitis. *J. Immunol.* 157:1333-1336, 1996.

32. Hurwitz, A.A., Sullivan, T.J., Krummel, M.F., Sobel, R.A., Allison, J.P., Specific Blockade of CTLA4/B7 interactions results in exacerbated clinical and histologic disease in an actively induced model of Experimental Allergic Encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 73:57-62, 1997.
33. Karandikar, N.J., Eagar, T.N., Vanderlugt, C.L., Bluestone, J.A., Miller, S.D. CTLA4 Downregulates Epitope Spreading and Mediates Remission in Relapsing Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Neuroimmunology* 109: 173-180, 2000.
34. Krummel, M.F. & Allison, J.P. CD28 and CTLA4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J. Exp. Med.* 182:459-466, 1995.
35. Krummel MF and Allison , J.P. CTLA4 engagement inhibits IL2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. *J. Exp. Med.* 183:2533-2544, 1996
36. Brunner MC, Chambers CA, Chan FK, Hanke J, Winoto A, Allison JP. CTLA4 mediated inhibition of early events of T cell proliferation. *J. Immunol.* 162:5813 - 5820, 1999
37. Chen, W, Jin, W., Wahl, S.M. Engagement of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA4) induces Transforming Growth Factor β (TGF β) production by murine CD4 T cells. *J. Exp. Med.* 188:1849-1857, 1998.
38. Gribben, J.G., Freeman, G.J., Boussiotis, V.A., Rennert, P., Jells, C.L., Greenfield, E., Barber, M., Restivo V.A., Ke, X., Gray, C.S., Nadler, L.M. CTLA4 mediates antigen-specific apoptosis of human T cells. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 92:811-815, 1995.
39. Scheipers, P. & Reiser, H. Fas-Independent death of activated CD4⁺ T lymphocytes induced by CTLA4 crosslinking. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 10083-88, 1998.
40. Segal B.M., Cross A.H. Fas (t) track to apoptosis in MS-TNF receptors may suppress or potentiate CNS demyelination. *Neurology* 55: 906-907, 2000
41. Comi, C. Leone, M., Bonisconi, S., DeFranco, S., Bottarel, F., Mezzatesta C., Chiocchetti, A., Perla F, Mònaco, F., Dianzani, U., Defective T cell Fas function in patients with multiple sclerosis. *Neurology* 55: 921-927, 2000

42. Sharief M.K., Noori M.A., Zoukos Y. Reduced expression of the inhibitor of apoptosis proteins in T cells from patients with multiple sclerosis following interferon β therapy. *J. Neuroimmunol.* 129:224-231, 2002
43. Knipping E, Debating KM, Stricker K, Keilig B, Eder A., Krammer Ph. Identification of soluble APO-1 in supernatants of human B and T-cell lines and increased serum levels in B and T leukemias. *Blood* 85:1562-9, 1995
44. Papoff, G., Cascino, I., Eramo, A., Starace, G., Lynch, D.H., Ruberti, G., Na N-terminal domain shared by Fas/Apo1(CD95) soluble variants prevents cell death in vitro *J. Immunol.* 156:4622-4630, 1996
45. Zipp, F., Weller, M., Calabresi, P.A., Frank, J.A., Bash, C.N., Dichgans, J., McFarland, H.F., Martin, R. Increased Serum Levels of Soluble CD95 (APO-1/Fas) in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 43:116-12, 1998.
46. Genain CP, Cannella B, Hauser SL, Raine CS. Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. *Nat Med*; 5:170-75, 1999
47. White CA, Nguyen KB, Pender MP. B cell apoptosis in the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis: roles of B cells, CD95, CD95L and Bcl-2 expression. *J. Autoimmun.* 14:194-204, 2000.
48. Rep M.H.G., Schrijver H.M., van Lopik T., Hintzen, R.Q., Roos, M.T.L., Ader, H.J., Polman, C.H., van Lier R A.W. Interferon beta treatment enhances CD95 and interleukin 10 expression but reduces interferon gamma producing T cells in MS patients. *J. Neuroimmunol.* 96: 92-100, 1999
49. Cheng, J., Zhou, T., Liu, C. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* 263:1759-1762, 1994.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Proliferative response of lymphocytes from patients with multiple sclerosis, both with and without treatment with IFN β , as well healthy individuals, after stimulation with PHA, MBP and Myelin. Results expressed as stimulation index (Figure 1).

Figure 2. Percentage of surface (0 hour) and intracellular CTLA4 molecules (20 h in culture) in patients with multiple sclerosis, both with and without treatment with IFN β , as well as healthy individuals.

Figure 3. Correlation between the intracellular CTLA4 molecule expression and lymphocyte proliferative response to MBP and myelin. **A)** R square = -0,35091 (p=0,1317) **B)** R square = -0,57775 (p=0,00757) **C)** R square = -0,11765 (p=0,3815) **D)** R square = -0,24997 (p=0,2166) **E)** R square = -0,5215 (p=0,0230) **F)** R square = 0,21622 (p=0,3207).

Figure 4. Percentage of surface Fas molecules on lymphocytes in patients with multiple sclerosis, before and after treatment with IFN β .

Figure 5. Percentage of surface Fas molecules on CD4 and CD8 lymphocytes in patients with multiple sclerosis, both with and without treatment with IFN β , as well as healthy individuals.

Figure 6. Quantification of soluble Fas molecules in patients with Multiple Sclerosis, both with and without treatment with IFN β , as well as healthy individuals.

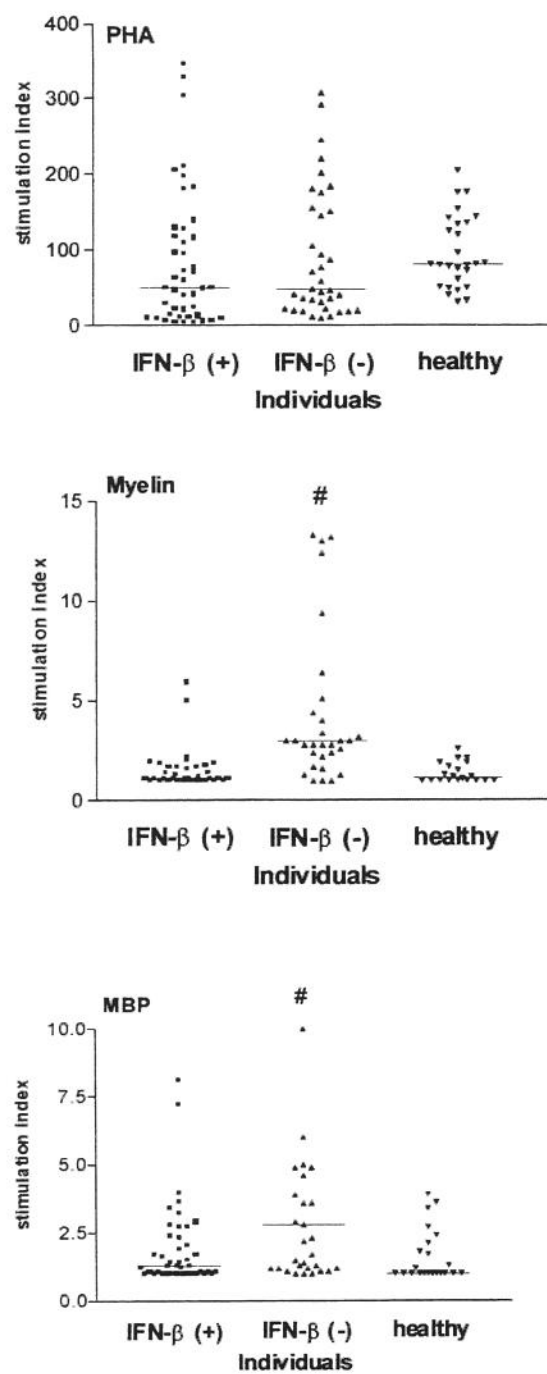


Figure 1

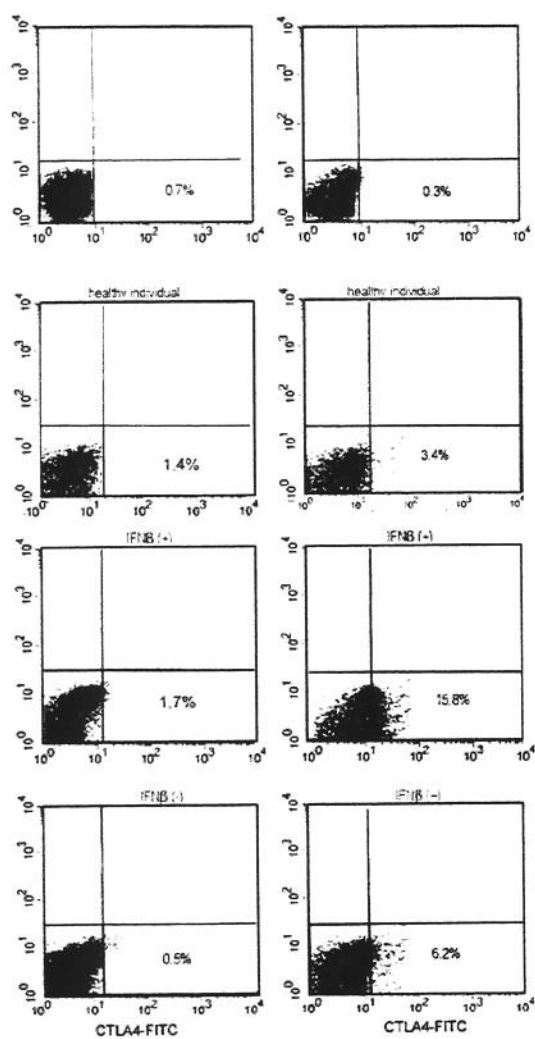


Figure 2

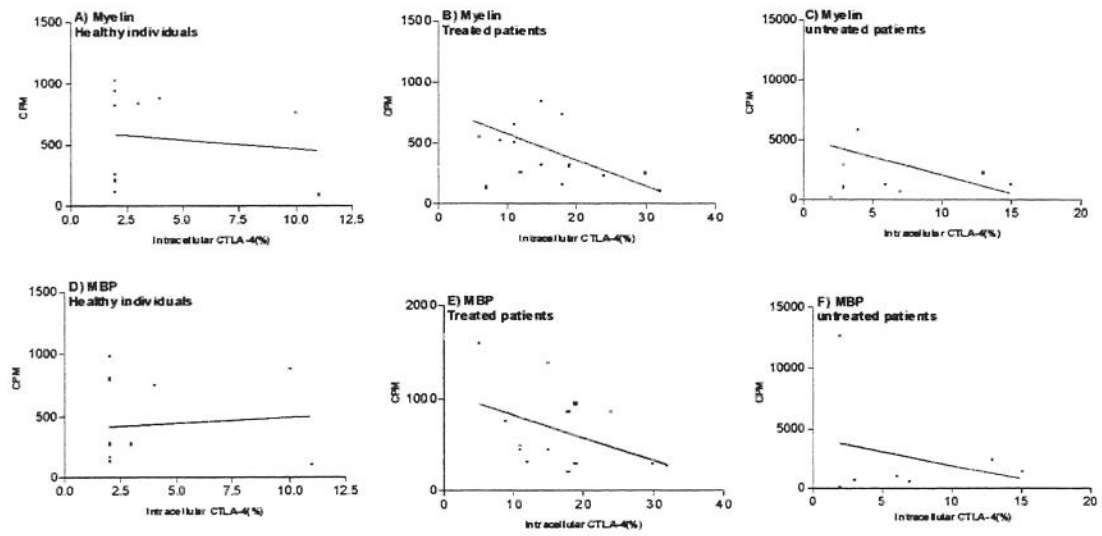


Figure 3

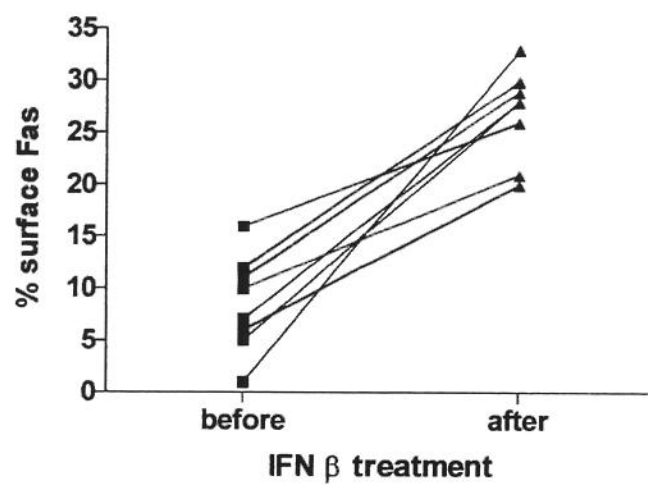


Figure 4

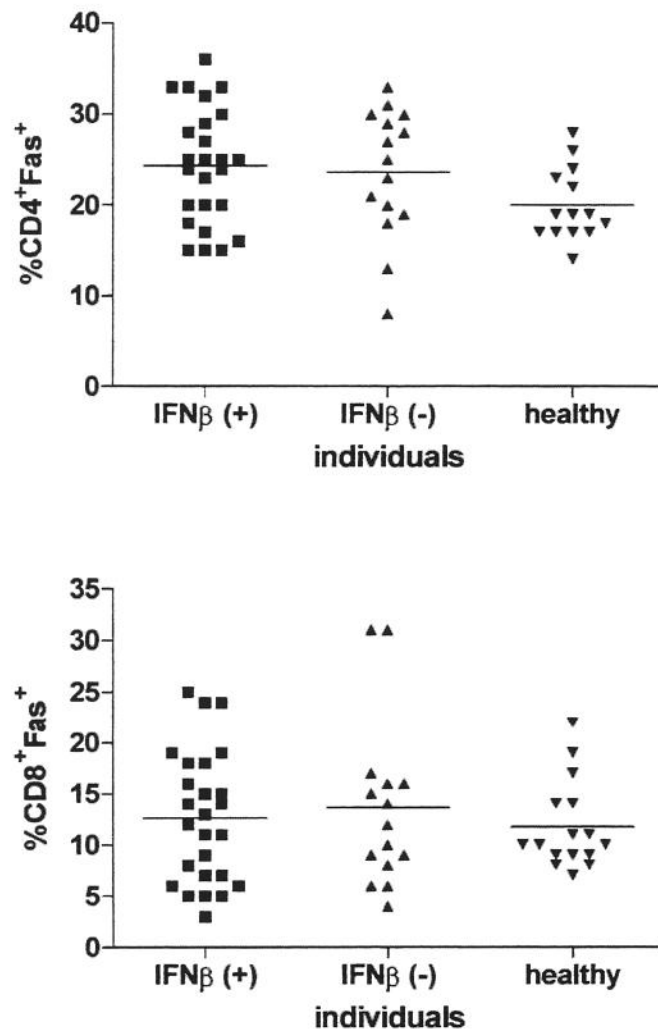


Figure 5

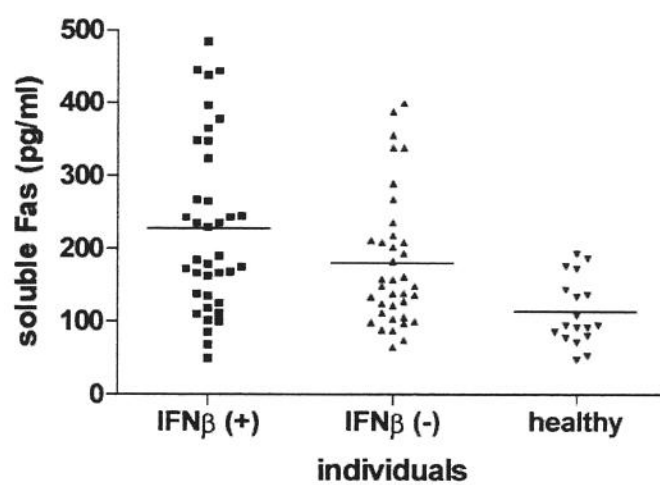


Figure 6

4- DISCUSSÃO GERAL

Está bem aceito na literatura que os indivíduos convivem com os clones auto-reativos e auto-anticorpos sem necessariamente desenvolver doenças. Logo, existem mecanismos altamente especializados que mantêm essas células sob controle. As doenças auto-imunes surgem quando há disfunção na regulação dos mecanismos de auto-imunidade. Os mecanismos de manutenção da tolerância periférica mais conhecidos são anergia e/ou deleção dos clones auto-reativos e a polarização da produção de determinadas citocinas. No presente trabalho, estudamos alguns mecanismos que levam à deleção e/ou anergia dos clones auto-reativos.

A Esclerose Múltipla embora seja uma doença órgão-específica, com a reação auto-imune compartimentalizada no sistema nervoso central, uma série de alterações é observada nas células da periferia (COSTA *et al.*, 2000). Inicialmente, estudamos o efeito da imunoterapia com o IFN β , na resposta proliferativa de linfócitos estimulados, tanto pelo mitógeno inespecífico, como pelos neuro-antígenos (mielina e MBP). A avaliação da resposta proliferativa dos linfócitos, em resposta aos mitógenos inespecíficos, é um método clássico de mensurar a resposta imune celular dos indivíduos. Quando avaliamos a resposta proliferativa em resposta à PHA, verificamos que houve discreta diminuição no grupo de pacientes com E.M. tratados com IFN β . Com relação ao estímulo com neuro-antígenos, observou-se uma redução significativa da resposta blastogênica em pacientes tratados. Resultados semelhantes obtivemos quando estudamos animais com E.A.E. tratados com IFN β , em estímulo à ConA e MBP, reforçando a propriedade imunomoduladora e anti-proliferativa do IFN β . Estes dados sugerem que os mecanismos imunes que mantêm os linfócitos auto-reativos sobre controle estão danificados nos pacientes com E.M. e animais com E.A.E. Assim, abordagens terapêuticas como a imunoterapia com IFN β , que regula negativamente a ativação das células T, é útil para minimizar danos das reações auto-reativas.

Os mecanismos pelos quais o IFN β limita a expansão de células T reativas à mielina não está totalmente esclarecido. Uma possibilidade é que o IFN β antagoniza os efeitos do IFN γ inibindo a expressão das moléculas de MHC classe II em vários tipos de células, assim como a apresentação do antígeno e a ativação dos linfócitos T (PETEREIT

et al., 1997; YASUDA *et al.*, 1999). Outra possibilidade seria a indução de apoptose nas células T ou a modificação na expressão de moléculas coestimulatórias.

A primeira evidência demonstrando que a ligação do receptor do antígeno (TCR) com o peptídeo no contexto da molécula de MHC não era suficiente para a ativação dos linfócitos T foi feita por Jenkins e Schwartz no final da década de 80 (MULLER, JENKINS e SCHWARTZ, 1989). Esses autores demonstraram que os clones de linfócitos T que recebiam somente o sinal do TCR não se tornavam ativados, mas entravam num estado de não resposta específica para o antígeno, conhecida como anergia. Os autores mostraram que a ativação era dada por um segundo sinal coestimulatório, fornecido por moléculas na superfície das células apresentadoras do antígeno. Esta bem descrito na literatura que a ativação dos linfócitos tem lugar quando há ligação da molécula CD28 expressa na membrana dos linfócitos com seus co-receptores na superfície das células apresentadoras do antígeno (CD80, CD86). Hoje, há certa concordância na literatura, que o sinal dado pela molécula CD28, influencia positivamente a ativação linfocitária, enquanto o sinal dado pela molécula co-estimulatória CTLA4 (CD152) é negativo na ativação de linfócitos. Essa molécula aparece na fase mais tardia da ativação celular, sendo responsável pela inibição do crescimento e por induzir apoptose (GRIBBEN *et al.*, 1995, SCHEIPERS e REISER, 1998).

A importância da molécula CTLA4 na desmielinização tem sido demonstrada no modelo animal. O bloqueio desta molécula acelera o surgimento da E.A.E, e está associado com o aumento na frequência de lesões inflamatórias no SNC, aumento de secreção de citocinas pro-inflamatórias e aumento de respostas proliferativas com estimulação de antígeno *in vitro* (PERRINN *et al.*, 1996; HURWITZ *et al.*, 1997). No presente estudo, o número de moléculas CTLA4 intracelular aumentou em pacientes portadores de E.M. em tratamento com IFN β e esse aumento foi correlacionado com a diminuição da resposta linfoproliferativa à estimulação do antígeno. Nós não fomos capazes de demonstrar a expressão desta molécula na superfície dos linfócitos na E.M., nem mesmo após 24h de cultura, pois provavelmente uma maior exposição com o mitógeno poderia ter resultado em tal expressão. Nós demonstramos também, que a terapia com IFN β reduz a expressão das moléculas CD80 e aumenta a expressão de CTLA4 na E.A.E., essas

observações podem explicar, pelo menos em parte, a redução da ativação dos linfócitos T e consequentemente os efeitos benéficos da imunoterapia no tratamento da E.A.E.

Os mecanismos pelos quais a molécula CTLA4 exerce seu efeito supressor na ativação dos linfócitos T, é uma área ativa de investigação. A molécula CTLA4 pode, pelo menos em parte, competir com CD28 para os ligantes CD80/CD86, servindo assim como atenuador indireto dos sinais coestimulatórios. A ligação das moléculas CTLA4 pode inibir a produção de IL2 e consequentemente a ativação de células T. A molécula CTLA4 pode estar envolvida na estimulação da produção de citocinas anti-inflamatórias (TGF β) (GOMES *et al.*, 2000), ou ainda, a ligação do CTLA4 pode induzir apoptose das células T, já que tem sido demonstrado que a ligação desta molécula na superfície dos linfócitos T de murinos, leva a morte desses linfócitos (SCHEIPERS e REISER, 1998).

Tem sido proposto que defeito nos mecanismos que normalmente *deletam* os clones de linfócitos T auto-reativos estão envolvidos na etiologia da Esclerose Múltipla e no modelo experimental. Evidências mostram associação entre a perda das células T específicas para MBP e a remissão da E.A.E. (PENDER *et al.*, 1991). Isto sugere que as células T reativas aos antígenos próprios tornam-se refratárias à morte celular induzida pelo antígeno AICD (*antigen-induced cell death*), na fase ativa da doença.

Recentemente tem sido demonstrado que o tratamento com IFN β reduz a expressão dos inibidores de apoptose (SHARIEF *et al.*, 2002) e aumenta os níveis de apoptose dos linfócitos T dos pacientes (GNIADEK *et al.*, 2003).

No presente estudo, não foi testado a associação direta entre o aumento da expressão das moléculas CTLA4 e a apoptose, embora um aumento na expressão da molécula CTLA4 intracelular nos pacientes com E.M. estava relacionado ao simultâneo aumento das moléculas Fas (na forma solúvel e de superfície) após o tratamento com IFN β .

Pelo menos dois mecanismos são responsáveis pela indução de apoptose dos linfócitos T maduros. O primeiro atua através da citotoxicidade clássica, dependendo da ação da perforina e o segundo, a apoptose induzida pelo antígeno, através da estimulação do TCR, mecanismo que envolve a expressão da molécula Fas.

A molécula CD95 ou Fas, é uma molécula de superfície pertencente à família do receptor de TNF, que sinaliza apoptose quando ligada com seu ligante natural (CD95L). A importância desse sistema (CD95/CD95L) ficou evidente no modelo de camundongos mutantes com defeitos nos genes que codificam CD95 (*lpr*) e CD95L (*gld*). Esses camundongos desenvolvem doenças auto-imunes porque os linfócitos T ativados não entram em apoptose na periferia (DRAPPA *et al.*, 1996).

A molécula Fas também ocorre na forma solúvel, onde falta uma região transmembrana e é encontrado no soro humano. No presente estudo, pacientes portadores de E.M. não tratados com IFN β apresentam menos expressão desta molécula do que os pacientes tratados. A expressão de Fas na superfície de linfócitos CD4 pode estar associado a apoptose destas células, a qual pode estar envolvida no desenvolvimento da E.M. Assim, a ausência ou a diminuição na expressão desta molécula pode ser indicativo para a piora da doença. Nossos resultados não demonstram um significativo aumento na expressão da molécula Fas na superfície de células T CD4 em relação ao grupo não tratado e controle. O aumento da expressão da molécula Fas pode ser explicado pela expressão destas moléculas em outros leucócitos após o tratamento com IFN β . A participação de outros leucócitos deve ser considerado no processo de desmielinização. O papel das células B na doença desmielinizante e seu destino no SNC é desconhecido, embora exista uma evidência que anticorpos contra a mielina e antígenos axonais desempenham papel patogênico na E.M. Além disso, tem sido reportado que células B podem estar sendo eliminadas do SNC por apoptose durante recuperação espontânea da E.A.E. (WHITE *et al.*, 2000). Assim, é possível que o aumento de Fas na superfície observado em pacientes tratados com IFN β , está relacionado em outros leucócitos tais como as células B, ao contrário dos linfócitos T. A apoptose destas células também contribuem para a recuperação clínica dos pacientes.

No presente estudo, também demonstramos um significativo aumento no Fas solúvel em pacientes com E.M. tratados. Nossos dados estão de acordo com achados que sugerem que IFN β afeta a expressão do receptor Fas sobre as células T dos pacientes com E.M. que podem induzir apoptose, assim eliminando células auto-reativas (REP *et al.*, 1999). Esses resultados obtidos aqui podem ser um reflexo disso, mas pode ser o caso que

em algumas formas, a presença do Fas solúvel pode prevenir as células de sofrerem apoptose induzida pelo Fas e assim desempenharem um papel modulador no processo.

Os resultados apresentados aqui fornecem evidência da complexidade dos mecanismos que controlam a ativação das células T na E.M. e E.A.E.

Finalizando, os dados obtidos durante esse estudo mostram que o tratamento com o interferon beta modifica vários aspectos da resposta imunológica dos pacientes portadores de E.M e dos animais com E.A.E., mesmo quando estudamos linfócitos periféricos. Assim, a avaliação da resposta imune dos pacientes e dos animais em tratamento pode fornecer dados importantes sobre a evolução da imunoterapia.

5- CONCLUSÃO GERAL

Os dados obtidos durante a execução desse trabalho, nos permite concluir que:

Na E.A.E:

- 1) O tratamento com IFN β diminuiu a severidade da doença, enquanto que animais controle continuaram a apresentar surtos;
- 2) A administração do IFN β inibiu efetivamente a resposta de células T ao estímulo com MBP quando comparado com o grupo não tratado. A utilização desta imunoterapia também reduziu a resposta proliferativa dos linfócitos quando estimulados com mitógeno inespecífico (ConA);
- 3) Observou-se uma inibição na expressão da molécula CD80 em animais submetidos ao tratamento com IFN β , enquanto que não se notou diferença significativa na expressão das moléculas CD28 e CD86;
- 4) A expressão da molécula CTLA-4 na superfície dos leucócitos estava significativamente aumentada após a administração com IFN β em comparação com o grupo não tratado;

Na E.M:

- 1) Houve uma discreta diferença na resposta proliferativa de linfócitos estimulados por PHA nos três grupos de indivíduos estudados (E.M. tratados, E.M. não tratados e normais). A administração do IFN β inibiu efetivamente a resposta proliferativa dos linfócitos ao estímulo com os neuroantígenos (MBP e mielina) quando comparado com o grupo não tratado;
- 2) Houve um aumento significativo da molécula CTLA-4 intracelular de pacientes portadores de E.M tratados com IFN β quando comparado aos demais grupos;
- 3) Houve um aumento significativo da molécula Fas na superfície de leucócitos dos pacientes, após o tratamento com a imunoterapia;
- 4) Não houve diferença significativa da expressão da molécula Fas na superfície de células CD4 $^{+}$ entre os três grupos estudados. Similar resultado foi obtido na expressão desta molécula nas células CD8 $^{+}$;
- 5) Houve um aumento significativo da molécula Fas solúvel no grupo de pacientes portadores de E.M tratados com IFN β .

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bauer, J.M.; Bradl, W.F.; Hickey, S.; Forss-Petter, H.; Breitschopf, C.; Linington, H.; Lassmann, H. T Cell Apoptosis in Inflammatory Brain Lesions. Destruction of T Cells Does Not Depend on Antigen Recognition. **Am J Pathol**, 153: 715-724, 1998.
- Ben-Nun, A.; Cohen, I.R. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) Mediated By T Cells Lines: Process of Lines and Characterization of the Cell. **J Immunol**, 129:303-308, 1982.
- Bevilacqua, M.P. Endothelial-Leukocyte Adhesion Molecules. **Annu Rev Immunol**, 11:767-804, 1993.
- Born, W.; Dallas, A.; Boymel, J.; Shimic, T.; Young, D.; Brennan, P.; O'Brien, R.L. Recognition of a peptide antigen by heat shock reative gd T lymphocytes. **Science**, 249: 67 - 69, 1990.
- Bourdette, D.N.; Whitham, R.H.; Chou, Y.K.; Morrison, W.J.; Atherton, J.; Kenny, C.; Liefeld, D.; Hashim, G.A.; Offner, H.; Vandenbark, A.A. Immunity to TCR Peptides in Multiple Sclerosis. **Jour of Immunol**, 152: 2510-2519, 1994.
- Burns, F.R.; Xiaobin, L.; Shen, N.; Offner, H.; Chou, Y.; Vandenbark, A.A.; Heber-Katz, E. Both Rat and Mouse T Cell Receptors Specific for the Encephalitogenic Determinat of Myelin Basic Protein Use Similar Va and Vb-chain Genes even Though the Major Histocompatibility Complex and Encephalitogenic Determinants Being Recognized are Different. **J Exp Med**, 169: 27, 1989.
- Byrnes, A.A.; McArthur, J.C.; Karp, C.L. Interferon-b Therapy for Multiple Sclerosis Induces Reciprocal Changes in Interleukin 12 and Interleukin 10 Production. **Ann Neurol**, 51: 165-174, 2002.
- Chabot, S.; Yong V.W. Interferon Beta 1b Increases Interleukin 10 in a Model of T Cell-Microglia Interaction. Relevance to MS. **Neurology**, 55:1497-1504, 2000.
- Chen, Y.; Kuchroo, V.K.; Inobe, J.I.; Hafler, D.A.; Weiner, H.L. Regulatory T Cell Clones Induced by Oral Tolerance: Suppression of Autoimmune Encephalomyelitis. **Science**, 265:1237-1240, 1994.
- Cheng, J.; Zhou, T.; Liu, C. Protection From Fas-Mediated Apoptosis by a Soluble Form of the Fas Molecule. **Science**, 263:1759-1762, 1994.

- Choffon, M.; Jillard, C.; Gauthier, G.; Grau, G. Tumor Necrosis Factor Production as Possible Predictor of Relapse in Patients with Multiple Sclerosis. **Eur Cytokine Netw**, 433:523-531, 1993.
- Cohen, J.J.; Duke, R.C.; Fadod, V.A.; Sellins, K.S. Apoptosis and Programmed Cell Death in Immunity. **Annu Rev Immunol**, 10:267-274, 1992.
- Cohen, I.R. T Cell Vaccination for Autoimmune Disease: a Panorama. **Vaccine**, 20: 706-710, 2002.
- Comi, G.; Moiola, L. Glatiramer Acetate. **Neurology**, 17 (5): 244-58, 2002.
- Correale, J.; Gilmore, W.; McMillan, M.; Li, S.; McCarthy, K.; Le, T.; Weiner, L.P. Patterns of Cytokine Secretion by Autoreactive Proteolipid Protein-Specific T Cell clones during the course of multiple sclerosis. **J Immunol**, Mar 15;154(6):2959-68, 1995.
- Correale J.; Arias M.; Gilmore W. Steroid hormone regulation of cytokine secretion by proteolipid protein-specific CD4+ T cell clones isolated from multiple sclerosis patients and normal control subjects. **J Immunol**, Oct 1;161(7):3365-74, 1998.
- Correale, J.; Lund, B.; McMillan, M.; Ko, D.Y.; McCarthy, K.; Weiner, L.P. T Cell Vaccination in Secondary Progressive Multiple Sclerosis. **Jour of Neuroimmunol**, 107: 130-139, 2000.
- Costa, P.M.; Yasuda, C.L.; Scagliusi, S.M.; Diaz-Bardales, B.M.; Maciel, E., Damasceno, B.P.; Blotta, M.H.L.; Tilbery, C.P.; L.M.B. Santos. Pattern of Cytokine Secretion by Peripheral Blood Cells of Patients with Multiple Sclerosis in Brazil. **Multiple Sclerosis**, 6:293-299, 2000.
- De Maria, R.; Testi R. Fas-Fas L Interaction: A Common Pathogenic Mechanism in Organ-Specific Autoimmunity. **Immunol Today**, 19: 121-125, 1998.
- De Simone, R.; Giampaolo, B.; Giometto, P.; Gallo, G.; Levi, C.; Aloisi, F. The Costimulatory Molecule B7 is Expressed on Human Microglia in Culture and in Multiple Sclerosis Acute Lesions. **Neuropathol & Exp Neurol**, 54:175-187, 1995.
- Diaz-Bardales, B.M.; Novaski, S.M.S.; Castro, G.M.; Goes, A.E.; Mengel, J.; Santos, L.M.B. Modulation of the Severity of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by gd T Lymphocytes Activated by Mycobacterial Antigens. **Immunol Investigations**, 30: 245-258, 2001.

Diaz-Bardales, B.M.; Farias, A.S.; Novaski, S.M.S.; Oliveira, E.C.; Santos, L.M.B. Reduction of Severity of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis through Induction of Apoptosis of Myelin Basic Protein (73-83) Peptide Specific T Cells by Gd T Lymphocytes (Submetido a Publicação, 2002).

Dore-Duffy, P.; Newman, W.; Balabanov, R.; Lisak, R.P.; Mainolfi, E.; Rothlein, R.; Peterson, M. Circulating Soluble Adhesion Proteins in Cerebrospinal Fluid and Serum of Patients with Multiple Sclerosis: Correlation with Clinical Activity. **Ann Neurol**, 37:55-62, 1995.

Dowling, P.; Shang, G.; Raval, S. Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) Receptor /Ligand System in Multiple Sclerosis Brain. **J Exp Med**, 184:1513-1518, 1996.

Drappa, J.; Vaishnav, A.K.; Sullivan, K E. Fas Gene Mutations in the Canale' Smith Syndrome, an Inherited Lymphoproliferative Disorder Associated with Autoimmunity **N Engl J Med**, 335:1643-1649, 1996.

D'Souza, S.B.; Bonetti, B.; Balasingam, V. Multiple Sclerosis: Fas Signaling in Oligodendrocyte Cell Death. **J Exp Med**, 184:2361-2370, 1996.

Durelli, L.; Verdun, E.; Barbero, P.; Bergui, M.; Versino, E.; Ghezzi, A.; Montanari, E.; Zaffaroni, M. Independent Comparison of Interferon (INCOMIN) Trial Study Group. Every-other-day interferon beta-1b versus once-weekly interferon beta-1a for multiple sclerosis: results of a 2-year prospective randomised multicentre study (INCOMIN). **Lancet**, 359: (9316): 1453-60, 2002.

Freedman, M.S.; Ruijs, T.C.G.; O Selin, L.K.; Antel, J.P. Peripheral Blood gd T Cells Lyse Fresh Human Brain-Derived Oligodendrocytes. **Annual Neurology**, 30: 794-800, 1991.

Freeman, J.A.; Thompson, A.J.; Fitzpatrick, R.; Hutchinson, M. *et al.* Interferon beta 1b in the treatment of secondary progressive MS. Impact on Quality of Life. **Neurology**, 57: 1870-1875, 2001.

Gayo, A.; Mozo, L.; Soares, A.; Tunon, A.; Lahoz, C.; Gutierrez, C. Long-Term Effect of IFN β 1b Treatment on the Spontaneous and Induced Expression of IL10 and TGF β in MS Patients. **J Neurol Science**, 179:43-49, 2000.

- Ge, Y.; Grossman, R.I.; Udupa, J.K.; Fulton, J.; Constantinescu, C.S.; Gonzales-Scarano, F.; Babb, J.S. *et al.* Glatiramer Acetate (Copaxone) Treatment in relapsing-remitting MS: Quantitative MR assessment. **Neurology**, 54: 813-817, 2000.
- Genç, K.; Dona, D.L.; Reder, A.T. Increased CD80+ B Cells in Active Multiple Sclerosis and Reversal by Interferon beta-1b Therapy. **J Clin Invest**, 99: 2664-2671, 1997.
- Goel, N.; Ulrich, D.T.; Clair E.W. Lack of Correlation Between Serum Soluble Fas/APO-1 Levels and Autoimmune Disease. **Arthritis Rheum**, 38:1738-1743, 1995.
- Gomes, N.A.; Gattass C.R.; Barreto De Souza, V.; Wilson M.E.; Dos Reis., G.A. TGFb Mediates CTLA4 Suppression of Cellular Immunity in Murine Kalaazar. **J Immunol**, 164: 2001-8, 2000.
- Goodin, D.S.; Frohman, E.M.; Garmany, G.P.; Halper, J.; Likosky, W.H.; Lublin, F.D., Silberberg, D.H.; Stuart, W.H.; Van den Noort, S. Disease modifying therapies in Multiple Sclerosis. **American Academy of Neurology**, 169-178, 2001
- Gribben, J.G.; Freeman, G.J.; Boussiotis, V.A.; Rennert, P.; Jells, C.L.; Greenfield, E.; Barber, M.; Restivo V.A.; Ke, X.; Gray, C.S.; Nadler, L.M. CTLA4 Mediates Antigen-Specific Apoptosis of Human T Cells. **Proc Natl Acad Sci, USA** 92:811-815, 1995.
- Hafler, D.A.; Weiner, H.L. Multiple Sclerosis: A Central Nervous System and Systemic Autoimmune Disease. **Immunology Today**, 10: 104-107, 1989.
- Hallal, D.E.M.; Farias, A.S.; Oliveira, E.C.; Diaz-Bardales, B.M.; Brandao, C.O.; Protti, G.G.; Pereira, F.G.; Metze, I.L.; Santos L.M.B. Costimulatory Molecules Expression on Leukocytes from Mice with Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Treated with IFN beta. **Jour of Interferon & Cytokine Reserc**, 295-300, 2003.
- Hartung, H. P.; Reiners, K.; Archelos, J.J.; Michels, M.; Seeldrayers, P.; Heidenreich, F.; Pflughaupt, K.W; Toyka, K.V. Circulating Adhesion Molecules and Tumor Necrosis Factor in Multiple Sclerosis: Correlation with Magnetic Resonance Imaging. **Ann Neurol**, 38:186-193, 1995.
- Hartung, H.P. Current status of interferon beta-1b in multiple sclerosis therapy. **Med Clin**, 96(1): 11-6, 2001.

- Hermans, G.; Denzer, U.; Lohse, A.; Raus, J.; Stinissen, P. Cellular and Humoral Immune Responses Against Autoreactive T Cells in Multiple Sclerosis Patients After T Cell Vaccination. **Jour Autoimmunity**, 13: 233-246, 1999.
- Huang, Y.M.; Hussien, Y.; Jin, Y-P.; Soderstrom, M.; Link, H. Multiple Sclerosis: Deficient in vitro Responses of Blood Mononuclear Cells to IFN β . **Acta Neurol Scand** 104: 249-256, 2001.
- Huang, Y.M.; Stoyanova, N.; Hussien, Y.; Jin, Y.P.; Teleshova, N.; Xiao, B.G., *et al.* Altered Phenotype and Function of Blood Dendritic Cells in Multiple Sclerosis are Modulated by IFN β and IL10. **Clin Exp Immunol**, 124: 306-314, 2001.
- Hurwitz, A.A.; Sullivan, T.J.; Krummel, M.F.; Sobel, R.A.; Allison, J.P. Specific Blockade of CTLA4/B7 Interactions Results in Exacerbated Clinical and Histologic Disease in an Actively Induced Model of Experimental Allergic Encephalomyelitis. **J Neuroimmunol**, 73:57-62, 1997.
- Hussien, Y.; Sanna, A.; Soderstrom, M.; Link, H.; Huang, Y.M. Glatiramer Acetate and IFN β act on Dendritic Cells in Multiple Sclerosis. **Journal of Neuroimmunol**, 121: 102-110, 2001.
- Itoh, N.; Yonehara, S.; Ishii, A.; Yonehara, M.; Mizushima, S. I.; Sameshima, M.; Hase, A.; Seto, Y.; Nagata, S. The Polypeptide Encoded by the cDNA for Human Cell Surface Antigen Fas can Mediate Apoptosis. **Cell**, 66:233-243, 1991.
- Jacobs, L.D.; Cookfair, D.L.; Rudick, R.A. Intramuscular Interferon Beta-1a for Disease Progression in Relapsing Multiple Sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). **Ann Neurol**, 39:285-294, 1996.
- Javed, N.H.; Gienapp, I.E.; Cox, K.L.; Whitacre, C.C. Exquisite peptide specificity of oral tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Immunol**, Aug 1;155(3):1599-605, 1995.
- Johns, L.D.; Flanders, K.C.; Ranhes, G.E.; Sriram, S. Successful Treatment of Experimental Allergic Encephalomyelitis by Transforming Growth Factor beta **J Immunol**, 147:1792-1796, 1991.

- Johnson, K.P.; Brooks, B.R.; Cohen, J.A *et al.* Copolymer-1 Reduces Relapse Rate and Improves Disability in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis: Results of a Phase III Multicenter, Double Blind, Placebo Controlled Trial. The Copolymer-1 Multiple Sclerosis Study Group. **Neurology**, 45: 1268-76, 1995.
- Johnson K.P.; Nelson B.J. MS: Diagnostic usefulness of Cerebrospinal Fluid. **Ann Neurol**, 5: 425-31, 1977.
- June, C.H.; Ledbetter, J.A.; Linsley, P.S.; Thompson, C.B. Role of the CD28 Receptor in T-Cell Activation. **Immunol Today**, 11:211-216, 1990.
- Karandikar, N.J.; Eagar, T.N.; Vanderlugt, C.L.; Bluestone, J.A.; Miller, S.D. CTLA4 Downregulates Epitope Spreading and Mediates Remission in Relapsing Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **J Neuroimmunology**, 109: 173-180, 2000.
- Karp, C.L.; Biron, C.A.; Irani, D.N. Interferon- γ in Multiple Sclerosis: is IL12 Suppression the Key? **Immunol Today**, vol 21, nº1, 24-28, 2000.
- Khoury, S.; Akalin, E.; Chandraker, A.; Turka, L.A.; Linsley, P.S.; Sayegh, M.H.; Hancock, W.W. CD28-B7 Costimulatory Blockade by CTLA4 ig Prevents Actively Induced Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Inhibits Th1 but Spares Th2 Cytokines in the Central Nervous System. **J Immunol**, 155:4521-4524, 1995.
- Kobayashi, Y.; Kawai, K.; Ito, K.; Honda, H.; Sobue, G.; Yoshikai, Y. Aggravation of Murine Experimental Allergic Encephalomyelitis by Administration of T Cell Receptor α specific antibody. **J Neuroimmunol**, 73: 169-174, 1997.
- Krummel, M.F.; Allison, J.P. CD28 and CTLA4 Deliver Opposing Signals Which Regulate the Response of T Cells to Stimulation. **J Exp Med**, 182:459-466, 1995.
- Kuchroo, V.K.; Martin, C.A.; Greer, J.M.; Ju, S.T.; Sobel, R.A.; Dorf, M.E. Cytokines and Adhesion Molecules Contribute to the Ability of Myelin Proteolipid in-Specific T Cells Clones to Mediated Experimental Allergic Encephalomyelitis. **J Immunol**, 151: 4371-4382, 1993.
- Kuchroo, V.K.; Prabhudas, M.; Brown, J.A.; Ranger, A.M.; Zamvil, S.S.; Sobel, R.A.; Weiner, H.L.; Nabavi, N.; Glimcher, L.H. B7.1 and B7.2 Costimulatory Molecules Activate Differentially the Th1-Th2 Developmental Pathways: Application to Autoimmune Disease Therapy. **Cell**, 80: 707-718, 1995.

- Lenardo, M.J. Interleukin 2 Programs Mouse Alpha Beta T Lymphocytes for Apoptosis. **Nature**, 353:858-861, 1991.
- Lenardo, M.J.; Chan, K.M.; Hornung, F.; McFarlane, H.; Siegel, R.; Wang, J.; Zheng, L. Mature T Lymphocyte Apoptosis Immune Regulation in a Dynamic and Unpredictable Antigenic Environment. **Annual Rev Immunol**. 17: 221-53, 1999.
- Lenschow, D.J.; Walunas, T.L.; Bluestone, J.A. CD28-B7 System of T Cell Costimulation. **Annu Rev Immunol**, 14:233-58, 1996.
- Liblau, R.S.; Singer, S.M. Mcdevitt, H.O. Th1 and Th2 CD4+ Cells in the Pathogenesis of Organ-Specific Autoimmune Diseases. **Immunol Today**, 16:34-38, 1995.
- Liblau, R.S.; Tisch, R.; Bercovic, N.; Mcdevitt H.O. Systemic Antigen in the Treatment of T Cell-Mediated Autoimmune Diseases. **Immunology Today**, 18: 599-604, 1997.
- Lider, O.; Santos, L.M.B.; Lee, C.S.Y.; Higgins, P.J.; Weiner, H.L. Suppression of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by the Oral Administration of Myelin Basic Protein. II. Suppression of the Disease and in vitro Immune Responses Mediated by Antigen-Specific CD8+ T Lymphocytes. **J Immunol**, 141: 7480753, 1989.
- Liu, Z.; Pelfrey, C.M.; Coteleur, A.; Lee, J.C.; Rudick, R.A. Immunomodulatory Effects of Interferon beta-1^a in Multiple Sclerosis. **Journ of Neuroimmunol**, 112: 153-162, 2001.
- Losy, J.; Michalowska-Wender, G. In vivo Effect of Interferon- β 1a on Interleukin-12 and TGF β Cytokines in Patients with Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. **Acta Neurol Scand**, 106: 44-46, 2002.
- Lublin, F.D.; Reingold, S.C. Defining the Course of Multiple Sclerosis. **Neurology**, 46: 907-911, 1996.
- MacDonald, H.R.; Lees, R.K. Programmed Death of Autoreactive Tymphocytes. **Nature**, 343:642, 1990.
- McCombe, P.; Nickson, I.; Tabi, Z.; Pender, M.P. Apoptosis of V β 8.2 T Lymphocytes in the Spinal Cord During Recovery from Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Induced in Lewis Rat by Inoculation with Myelin Basic Protein. **J Neurol Sci**, 139: 1-6, 1996.

- Miller, A.; Al-Sabbagh, A.; Santos, L.M.B.; Prabhu Das, M.; Weiner, H.L. Epitopes of Myelin Basic Protein That Trigger TGF β Release after Oral Tolerization are Distinct from Encephalitogenic Epitopes and Mediate Epitope-Driven Bystander Suppression. **J Immunol**, 151:7307-7315, 1993.
- Miller, S.D.; Vanderlugt, C.L.; Lenchow, D.J.; Pope, J.G.; Karandikar, N.J.; Dal Canto M.C.; Bluestone, J.A. Blockade of CD80/B7-1 Interaction Prevents Epitope Spreading and Clinical Relapses of Murine EAE. **Immunity**, 3: 739-745, 1995.
- Miller, D.H.; Grossman, R.I.; Reingold, S.C.; MacFarland, H.E. The role of Magnetic Resonance Techniques in understanding and Managing Multiple Sclerosis. **Brain**, 121:3-24, 1998.
- Mosmann, T.R.; Chervinski, H.; Bond, M.W.; Gidlin, M.A.; Coffman, R.L. Two Types of Murine Helper T Cell Clone. I. Definition According to Profiles of Lymphocytes Activities and Secreted Proteins. **J Immunol**, 136: 2348-2357, 1986.
- Mokhtarian, F.; Shi, Y.; Shirazian, D.; Morgante, L.; Miller, A.; Grob, D. Defective Production of Anti-Inflammatory Cytokine TGF β by T Cell Lines of Patients with Active Multiple Sclerosis. **J Immunol**, 152:6003-6011, 1994.
- Mueller, D.L.; Jenkins, M.K.; Schwartz, R.H. Clonal Expansion Versus Functional Clonal Inactivation: A Costimulatory Signalling Pathway Determines the Outcome of T Cell Antigen Receptor Occupancy. **Annu Rev Immunol**, 7: 445-80, 1989.
- Navikas, V.; Link, H. Cytokines and the Pathogenesis of Multiple Sclerosis. **J Neurosc Res**, 45: 322-333, 1996.
- Neighbour, P.A.; Grayzel, A.I.; Miller, A.E. Endogenous and Interferon-augmented natural Killer Cell Activity of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells *in vitro*. Studies of Patients with MS, Systemic Lupus Erythematosus or Rheumatoid Arthritis. **Clin Exp Immunol**, 49: 11-21, 1982.
- Noronha, A.; Toscas, A.; Jensen, M.A. Interferon Beta Decreases T Cell Activation and Interferon Gamma Production in Multiple Sclerosis. **J Neuroimmunol**, 46:145-154, 1993.

- Oehm, A.; Behrmann, I.; Falk, W.; Pawlita, M.; Maier, G.; Klas, G.; Li-Weber, C.M.; Richards, S.; Dhein, J.; Trauth, D.C. Purification and Molecular Cloning of the APO-1 Cell Surface Antigen, a Member of the Tumor Necrosis Factor/Nerve Growth Factor Receptor Superfamily. Sequence Identity with the Fas Antigen. **J Biol Chem**, 267:10709-10715, 1992.
- Offner, H.; Hashim, G.A.; Vandenbark, A.A. T Cell Receptor Peptide Therapy Triggers Autoregulation of Experimental Encephalomyelitis. **Science**, 251: 430, 1991.
- Offner, H.; Adlard, K.; Bebo, Jr.B.F.; Schuster, J.; Burrows, G.G.; Buenafe, A.C.; Vandenbark, A.A. Vaccination with BV8S2 Protein Amplifies TCR Specific Regulation and Protection against Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in TCR BV8S2 Transgenic Mice. **J Immunol**, 161: 2178-2186, 1998.
- Ota, K.; Matsui, M.; Milford, E.L.; Mackin, G.A.; Weiner, H.L.; Hafler, D.A. T-Cell Recognition of an Immunodominant Myelin Basic Protein Epitope in Multiple Sclerosis. **Nature**, 346: 183-187, 1990.
- Panitch, H.S.; Hirsch, R.L.; Schindler, J.; Johnson, K.P. Treatment of Multiple Sclerosis with Gamma Interferon: Exacerbations Associated with Activation of the Immune System. **Neurology**, 37:1097-1102, 1987.
- Paty, D.W.; Li, D.K. (Ubc Ms/Mri Study Group and the IFN β Multiple Sclerosis Study Group), Interferon Beta 1b is Effective in Relapsing –Remitting Multiple Sclerosis. Ii Mri Analysis of Results of a Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo Controlled Trial. **Neurology**, 43:662-7, 1993.
- Pelfrey, C.M.; Tranquill, L.R.; Boehme, S.A.; Mcfarland, H.F.; Lenardo, M.J. Two Mechanisms of Antigen-Specific Apoptosis of Myelin Basic Protein (MBP)-Specific T Lymphocytes Derived from Multiple Sclerosis Patients and Normal Individuals. **J Immunol**, 154:6191-6202, 1995.
- Petereit, H.F.; Bamborschke, S.; Esse, A.D.; Heiss, W.D. Interferon Gamma Producing Blood Lymphocytes are Decreased by Interferon Beta Therapy in Patients with Multiple Sclerosis. **Multiple Sclerosis**, 3:180-3, 1997.

- Pender, M.P.; Nguyen, K.B.; McCombe, P.A.; Kerr, J.F.R. Apoptosis in the Nervous System in Experimental Allergic Encephalomyelitis. **J Neurol Sci**, 104: 81-87, 1991.
- Pender, M.P.; McCombe, P.A.; Yoong, G.; Nguyen, K.B. Apoptosis Of V β 8.2 Lymphocytes in the Nervous System in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: Its Possible Implications for Recovery and Acquired Tolerance. **J Autoimmun**, 5: 401-410, 1992.
- Perrinn, P.J.; Maldonado, J.H.; Davis, T.A.; June, C.H.; Racke, M.K. CTLA4 Blockade Enhances Clinical Disease and Cytokine Production During Experimental Allergic Encephalomyelitis. **J Immunol**, 157:1333-1336, 1996.
- Peterman, G.; Spencer, C.; Sperling, A.I.; Bluestone, J.A. Role of gd T Cells in Murine Collagen Induced Arthritis. **J Immunol**, 151:6546-6558, 1993.
- Poser, C.M.; Paty, D.W.; Scheinberg, L. New Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis: Guidelines for Research Protocols. **Ann Neurol**, 13:227-231, 1983.
- Rajan, A.J.; Gao, Y.L.; Raine, C.S.; Brosnan, C.F. A Pathogenic Role for gd T cells in Relapsing-Remitting Experimental Allergic Encephalomyelitis in the SJL Mouse. **J Immunology**, 157: 941-949, 1996.
- Read, S.; Malmstrom, V.; Powrie, F. Cytotoxic T Lymphocyte Associated Antigen 4 Plays an Essential Role in the Function of CD25CD4 Regulatory Cells that Control Intestinal Inflammation. **J Exp Med**, 192: 295-302, 2000.
- Rep, M.H.; Schrijver, H.M.; Van Lopik, T.; *et al.* Interferon beta treatment enhances CD95 and IL10 expression but reduces interferon gamma producing T cells in MS patients. **J Neuroimmunol**, 96: 92-100, 1999.
- Rudick, R.A.; Carpenter, C.S.; Cookfair, D.L.; Tuohy V.K.; Ransohoff, R.M. In vitro and in vivo Inhibition of Mitogen-Driven T-Cell Activation by Recombinant Interferon Beta. **Neurology**, 43: 2080-2087, 1993.
- Russell, J.H.; Rush, B.; Weaver, C.; Wang, R. Mature T Cells of Autoimmune Lpr-Lpr Mice Have a Defect in Antigen Stimulated Suicide. **Proc Natl Acad Sci, USA** 90: 4409-4413, 1993.

- Ruuls, S.R.; De Labie, M.C.D.C.; Weber, K.S. The Length of Treatment Determines Whether IFN beta Prevents or Aggravates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis In Lewis Rats. **J Immunol**, 157:5721-5731, 1996.
- Ruuls, S.R.; Sedgewick, J.D. Cytokine-Directed Therapies In Multiple Sclerosis and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **Immunol Cell Biol**, 76:65-73, 1998.
- Scheipers, P.; Reiser, H. Fas-Independent Death of Activated CD4+ T Lymphocytes Induced by CTLA4 Crosslinking. **Proc Natl Acad Sci, USA** 95: 10083-88, 1998.
- Selmaj, K.; Raine, C.S.; Cannella, B.; Brosnan, C.F. Identification of lymphotoxin and Tumor Necrosis Factor in Multiple Sclerosis Lesions. **J Clin Invest**, 87: 949, 1991.
- Sharief, M.K.; Noori, M.A.; Ciardi, M. Increased Levels of Circulating ICAM-1 in Serum and Cerebrospinal Fluid of Patients with Active Multiple Sclerosis. Correlation with TNF Alpha and Blood Brain Barrier Damage. **J Neuroimmunol**, 43: 15-21, 1993.
- Springer, T.A. Traffic Signals for Lymphocyte Recirculation and Leukocyte Emigration: The Multiple Step Paradigm. **Cell**, 76:301-314, 1994.
- Steinman, L.M.D. Multiple Sclerosis: A Coordinated Immunological Attack Against Myeli in the Central Nervous System. **Cell**, 85: 299-302, 1996.
- Stinissen, P.; Vandevyver, C.; Medaer, R.; Vandegaer, L.; Niess, J.; Tuyls, L.; Hafler, D.A.; Raus, J.; Zhang, J. Increased Frequency of gd T Cells in Cerebrospinal Fluid and Peripheral blood of Patients with Multiple Sclerosis. **J Immunol**, 154: 4883-4894, 1995.
- Suda, T.; Takahashi, T.; Golstein, P.; Nagata, S. Molecular Cloning and Expression of the Fas Ligand, a Novel Member of the Tumor Necrosis Factor Family. **Cell**, 75: 1169- 1178, 1993.
- Swanborg, R.H. Experimental autoimmune encephalomyelitis in rodents as a model for human demyelinating disease. **Clin Immunol Immunopathol**, 77(1):4-13, 1995.
- Tabi, Z.; McCombe, P.A.; Pender, M.P. Apoptotic Elimination Of V β 8.2+ Cells from the Central Nervous System During Recovery from Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Induced by the Passive Transfer of V β 8.2+ Encephalitogenic T Cells. **Eur J Immunol**, 24:2609-2617, 1994.

- Takahashi, T.; Tagami, T.; Yamazaki, S.; Ued, T.; Shimizu, J.; Sakagushi, N.; Mak, T.W.; Sakagushi, S. Immunologic Self Tolerance Maintained by CD25CD4 Regulatory T Cells Constitutively Expressing Cytotoxic T Lymphocyte Associated Antigen 4. **J Exp Med**, 192: 303-310, 2000.
- Tsukada, N.; Miyaagi, K.; Matsuda, M. Increased Levels of Circulating Intercellular Adhesion Molecule-1 in Multiple Sclerosis and Human T-Lymphotropic Virus Type 1 Associated Myelopathy. **Ann Neurol**, 33:591-596, 1993.
- Vanderaa, A.; Hellings, N.; Medaer, R.; Gelin, G.; Palmers, Y.; Raus, J.; Stinissen, P. T Cell Vaccination in Multiple Sclerosis Patients with Autologous CSF-Derived Activated T Cells: Results from a Pilot Stud. **Clin Exp Immunol**, 131: 155-168, 2003.
- Vandenbark, A.A.; Gill, T.; Offner, H. A myelin basic protein-specific T lymphocyte line that mediates experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Immunol**, 135(1): 223-8, 1985.
- Vandenbark, A.A.; Hashim, G.; Offner, H. Immunization With a Synthetic T Cell Receptor V Region Peptide Protects Against E.A.E. **Nature**, 341:541, 1989.
- Vandenbark, A.A.; Chou, Y.K.; Bourdette, D.; Whitham, R.; Hashim, G.; Offner, H. T Cell Receptor Peptide Therapy for Autoimmune Disease. **Jour Autoimm**, 5 (suplemento A): 83, 1992.
- Vandenbark, A.A.; Chou, Y.K.; Whitham, R.; Mass, M.; Buenafe, A.; Liefeld, D.; Kavanagh, D.; Cooper, S.; Hashim, G.A.; Offner, H. Treatment of Multiple Sclerosis with T Cell Receptor Peptides: Results of a Double-Blind Pilot Trial. **Nat Med**, 2: 1109-1115, 1996.
- Vandenbark, A.A.; Morgan, E.; Bartholomew, R.; Bourdette, D.; Whitham, R.; Carlo, D.; Gold, D.; Hashim, G.; Offner, H. TCR Peptide Therapy in Human Autoimmune Diseases. **Neurochem Res**, 26 (6): 713-30, 2001.
- Waksman, B. Mechanisms in Multiple Sclerosis. **Nature**, 318: 104-105, 1985.
- Walunas, T.L.; Lenchow, D.J.; Bakker, C.Y.L.; Linsley, P.S.; Freeman, G.J.; Green, J.M.; Thompson, C.B.; Bluestone J.A. CTLA4 can Function as Negative Regulation of T Cell Activation.. **Immunity**, 1:405-413, 1994.

- Washington, R.; Burton, J.; Todd, R.F. Expression of Immunologically Relevant Endothelial Cell Activation Antigens on Isolated Central Nervous System Microvessels from Patients with Multiple Sclerosis. **Ann Neurol**, 35: 89-97, 1994.
- Weiner, H.L.; Friedman, A.; Miller, A.; Khoury, S.J.; Al-Sabbagh, A.; Santos, L.M.B.; Sayegh, M.; Nussenblatt, R.B.; Trentham, D.E.; Hafler, D.A. Oral Tolerance: Immunologic Mechanisms and Treatment of Animal and Human Organ-Specific Autoimmune Diseases by Oral Administration of Autoantigens. **Ann Rev Immunol**, 12:809-837, 1994.
- Weiner, H.L. Oral Tolerance: Immune Mechanisms and Treatment of Autoimmune Diseases. **Immunol Today**, Vol. 18, n°7, 335-343, 1997.
- Weiner, H.L.; Rees, E.P. Mucosal Tolerance. **Immunol Letters**, 69: 3-4, 1999.
- Weiner, H.L. Oral Tolerance, an Active Immunologic Process Mediated by Multiple Mechanisms. **Jour of Clin Investigation**, N°8, 106: 935-937, 2000.
- Weiner, H.L.; Selkoe, D.J. Inflammation and Therapeutic Vaccination in CNS Diseases. **Nature**, 420: 879-884, 2002.
- Weintraub, J.P.; Godfrey, V.; Wolthusen, A.; Cheek, R.L.; Einsenberg, R.A.; Cohen, P.L. Immunological and Pathological Consequences of Mutations in Both Fas and Fas Ligand. **Cellular Immunol**, 186: 8-17, 1998.
- Williams, K.; Ulvestad, E.; Antel, J.P. B7/BB-1 Antigen Expression on Adult Human Microglia Studied in vitro and in situ. **Eur J Immunol**, 24:3031-3037, 1994.
- Wucherpfennig, K.W.; Newcombe, J.; Li, H.; Keddy, C.; Cuzner, M.L.; Hafler, D.A. $\gamma\delta$ T Cell Receptor Repertoire in Acute Multiple Sclerosis Lesions. **Proc Natl Acad Sci, USA**, 86: 4588, 1992.
- Yasuda, C.L.; Al-Sabbagh, A.; Oliveira, E.C.; Diaz-Bardales, B.M.; Garcia, C.A.A.C.; Santos, L.M.B. Interferon Beta Modulates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Altering the Pattern of Cytokine Secretion. **Immunol Investigations**, 28:115-126, 1999.
- Zang, Y.C.; Hong, J.; Tejada-Simon, M.V.; Li, S.; Rivera, V.M.; Killian, J.M.; Zhang, J.Z. Th2 Immune Regulation Induced by T Cell Vaccination in Patients with Multiple Sclerosis. **Eur J Immunology**, 30 (3), 908-13, 2000.

Zhang, J.Z.; Rivera, V.M.; Tejada-Simon, M.V.; Yang, D.; Hong, J.; Li, S.; Haykal, H., Killian, J.; Zang, Y.C.Q. T Cell Vaccination in Multiple Sclerosis: Results of a Preliminary Atudy. **J Neurology**, 249: 212-218, 2002.

Zhou, W.B.; Hans, L. Detection of the Soluble Form of the Fas Molecule in patients with Multiple Sclerosis. **Hunan, Yi Ke Da Xue Xue Bao(Chinese)**. Feb 28, 25 (1): 39-41, 2000.

Zipp, F.; Weller, M.; Calabresi, P.A.; Frank, J.A.; Bash, C.N.; Dichgans, J.; Mcfarland, H.F.; Martin, R. Increased Serum Levels of Soluble CD95 (APO-1/Fas) in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. **Ann Neurol**, 43:116-12, 1998.