

FERNANDO PRADELLA

EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO G-CSF NOS  
MECANISMOS EFETORES E IMUNORREGULADORES  
NA NEURITE EXPERIMENTAL AUTOIMUNE  
INDUZIDA EM RATOS LEWIS

EFFECT OF THE ADMINISTRATION OF THE G-CSF  
ONTO THE EFFECTOR AND IMMUNEREGULATORY  
MECHANISMS OF THE EXPERIMENTAL  
AUTOIMMUNE NEURITIS INDUCED IN LEWIS RATS

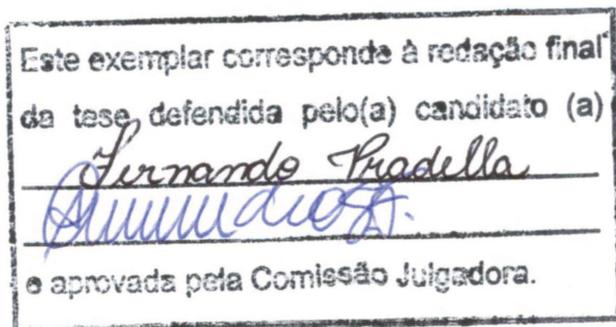
Campinas,  
2013

# Universidade Estadual de Campinas Instituto de Biologia

Fernando Pradella

EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO G-CSF NOS MECANISMOS EFETORES E IMUNORREGULADORES NA NEURITE EXPERIMENTAL AUTOIMUNE INDUZIDA EM RATOS LEWIS

EFFECT OF THE ADMINISTRATION OF THE G-CSF ONTO THE EFFECTOR AND IMMUNEREGULATORY MECHANISMS OF THE EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE NEURITIS INDUCED IN LEWIS RATS



Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do título de mestre em Genética e biologia molecular, na área de imunologia.

Dissertation presented to the Institute of Biology for obtaining the title of Master in Genetics and molecular biology, in the immunology area.

  
Orientador: Dr. Alessandro dos Santos Farias

# FICHA CATALOGRÁFICA

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

|       |  |
|-------|--|
| P881e | <p>Pradella, Fernando, 1987-<br/>Efeito da administração do G-CSF nos mecanismos efetores e imunorreguladores na neurite experimental autoimune induzida em ratos Lewis / Fernando Pradella. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.</p> <p>Orientador: Alessandro dos Santos Farias. Coorientador: Leonilda Maria Barbosa dos Santos. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Neurite auto-imune experimental. 2. Fator estimulador de colônias de granulócitos. 3. Linfócitos T reguladores. 4. Síndrome de Guillain-Barre. I. Farias, Alessandro dos Santos. II. Santos, Leonilda Maria Barbosa dos, 1950-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.</p> |
|-------|--|

## Informações para Biblioteca Digital

**Título em Inglês:** Effect of the administration of the G-CSF onto the effector and immunoregulatory mechanisms of the experimental autoimmune neuritis induced in Lewis rats

**Palavras-chave em Inglês:**

Experimental neuritis autoimmune  
Granulocyte colony-stimulating factor  
Regulatory T-lymphocytes  
Guillain-Barre syndrome

**Área de concentração:** Imunologia

**Titulação:** Mestre em Genética e Biologia Molecular

**Banca examinadora:**

Dr. Alessandro dos Santos Farias [Orientador]  
Prof. Dr. Marco Aurélio Ramirez Vinolo  
Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara

**Data da defesa:** 11-03-2013

**Programa de Pós Graduação:** Genética e Biologia Molecular

---

# Banca examinadora da dissertação de Mestrado

Fernando Pradella

---

---

Orientador: Dr. Alessandro dos Santos Farias

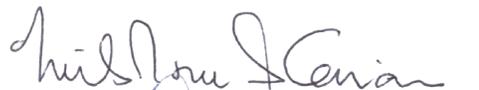
---

Membros:

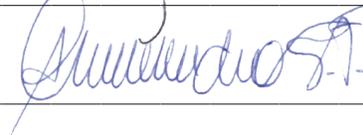
1. Prof. Dr. Marco Aurelio Ramirez Vinolo



2. Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara



3. Dr. Alessandro dos Santos Farias [Orientador]



4. Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud

---

5. Prof. Dr. Amilton Antunes Barreira

---

Curso de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular do  
Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas

---

Data: 11/03/2013

---

# DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado intitulada "EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO G-CSF NOS MECANISMOS EFETORES E IMUNORREGULADORES NA NEURITE EXPERIMENTAL AUTOIMUNE INDUZIDA EM RATOS LEWIS":

( ) não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

( ) CIBio – Comissão Interna de Biossegurança , projeto No. \_\_\_\_\_, Instituição: \_\_\_\_\_.

( X ) CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No 2035-1, Instituição: Instituto de Biologia (IB) / Unicamp.

( ) CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. \_\_\_\_\_, Instituição: \_\_\_\_\_.

*\* Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*

FERNANDO PRADILLA

Aluno: Fernando Pradella

Alessandro dos Santos Farias

Orientador: Alessandro dos Santos Farias

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido ( ) Indeferido

Carimbo e assinatura

ANA MARIA APARECIDA GUARALDO

Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO  
Presidente da CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

( ) Deferido ( ) Indeferido

Carimbo e assinatura

Trabalho realizado com apoio da FAPESP

#2011/15175-5

#2011/18728-5

# EPÍGRAFE

Triste época! É mais fácil desintegrar  
um átomo do que um preconceito.

*Albert Einstein*

# AGRADECIMENTOS

Agradecer deveria ser algo simples, porém nunca é. Não que falar um mero “muito obrigado” seja complicado. Mas ele por ele não me satisfaz. É sempre uma preocupação muito grande ter a certeza de que as pessoas importantes para mim saibam a importância que elas têm na minha vida. Há coisas que são muito óbvias para nós que as sentimos, mas nem sempre são tão óbvias assim pros outros. E por isso talvez esse texto fique um pouco meloso ou meio dramático, mas eu não me importo.

Como não poderia ser diferente, as duas pessoas mais importantes para a minha vida, e a quem sou mais grato, são os meus pais **José Luiz Pradella** e **Sandra Lúcia Boteon Pradella**, por serem quem são e como são. Por me oferecerem um amor infinito sempre, todo dia. Não posso deixar de agradecê-los pela compreensão quando erro, pela enorme preocupação quando passo por momentos não tão bons e pelo apoio e suporte incondicionais a todas as minhas decisões e vontades. Devo a eles absolutamente tudo que tenho e praticamente tudo que sou. Papai e mamãe, muito obrigado! Eu amo vocês dois, bastante.

Agradeço aos meus dois irmãos, **Arthur** e **Leonardo**, e a minha cunhada, **Pamela**. Pessoas simplesmente maravilhosas, que eu amo muito e que me amam também. A vocês 3, meu muito obrigado!

Sou muito grato às minhas avozinhas, **Beninha** e **Geny**, que são lindas demais e que eu amo da forma mais pura possível.

Agradeço ao resto da minha família, apesar de, infelizmente, não poder citar todos aqui, mas que são parte fundamental da minha felicidade. Faço questão de citar meus tios e padrinhos **Maria Inês** e **Alberto**, mais conhecidos como Tia Tica e Tio Beto, por tudo que sempre fizeram por mim e por completar a alegria dos almoços de domingo.

Quero agradecer aos meus amigos mais antigos **Xan**, **Ana Terra**, **Bi**, **Carol** e **Popô**, por terem sido tão amigos todo esse tempo. Claro que não podem faltar meus outros grandes amigos **Amauri**, **Thi**, **Kosha**, **Havi** e **Thalita**, aos quais sou grato por sempre estarem presentes na minha vida. Todos vocês, saibam que eu agradeço ao universo por ter colocado cada um na minha vida.

Preciso muito agradecer a 4 pessoas que inicialmente foram minhas professoras, mas que ocuparam um lugar no meu coração sem igual: **Naila**, **Marina**, **Marcela** e **Malu**. Eu adoro muito todas vocês. Obrigado por tudo.

Quero agradecer a **Alicia**, *mi tán querida madre putativa*, por ser magnífica como é. *Millones de gracias a ti!*

Eu só tenho a agradecer a queridíssima **Prof<sup>a</sup>. Leonilda Maria Barbosa dos Santos**, que me deu a primeira oportunidade, acolhendo-me, acreditando e investindo em mim durante a minha longa iniciação científica. Tenho que agradecer por fazer

desse laboratório um lugar especial para se trabalhar. Graças a ótima aula de imunologia dada por ela que estou nessa área. Professora Leo, meu eterno agradecimento a você.

Dizer que agradeço ao meu orientador **Alessandro dos Santos Farias** é muito pouco. Uma pessoa simplesmente espetacular e genial, um tanto amedrontadora no começo, confesso, mas que com pouco tempo nos revela a tremenda bondade que guarda em seu coração. Eu agradeço muito mesmo por acreditar tanto no meu potencial, por me ajudar todo dia, por se preocupar com a minha formação e com o meu sucesso profissional. Agradeço também por ser um orientador tão presente, acessível, solícito, compreensivo e amigo. Lê, muitíssimo obrigado.

Agradeço a minha mãe aqui no laboratório, a **Rosemeire Florença de Oliveira de Paula**. Quero que saiba que sou muito grato por ter me dado o privilégio de ser adotado como filhote desde muito cedo e ter me guiado e ajudado incondicionalmente no dia a dia desde que comecei a IC. Rose, você é muito especial para mim.

Faço questão de agradecer também a **Dani, Adriel, e Lidiane** por tudo que são, que fazem e que já fizeram por mim. Muito obrigado!

Sou grato aos outros companheiros de laboratório **Elaine, Mariana, Marília, Ana Leda, Gui, Walkyria, Paulinha, Alliny, Amanda, Gisele, Bruna, Felipe, Carlos Otávio** e ao grande **Marcos**, pelo carinho diário e ajuda que sempre dão quando preciso.

Não poderia deixar de agradecer a minha primeira filhotinha científica, **Renata**, por ter sido tão compromissada, interessada e solícita durante a sua IC. Uma aluna que logo foi solta e continuou andando com as próprias pernas aqui no laboratório. É uma pena que não seguirá mais na carreira acadêmica, mas eu sempre serei grato pela força dada para a obtenção dos resultados dessa dissertação. Re, muito obrigado mesmo.

Faço questão de agradecer a três ex-companheiras de laboratório, **Juliana, Vânia** e **Ana Milani**. Meu carinho por vocês sempre será muito grande.

Registro aqui o meu agradecimento a **Karina Degaki**, pela imensa paciência e ajuda dada a mim durante essa jornada.

E, por fim, mas não menos importante, eu quero deixar o meu muito obrigado a todos que não estão citados nesse texto mas que de alguma forma contribuíram para que os resultados aqui apresentados fossem obtidos.

## LISTA DE ABREVIATURAS

|               |   |
|---------------|---|
| A2AR          | Receptor para adenosina 2A                                    |
| APCs          | Células apresentadoras de antígenos                           |
| BDNF          | <i>Brain-derived neurotrophic factor</i>                      |
| BHN           | Barreira hematoneural   |
| cAMP          | Adenosina monofosfato cíclico                                 |
| CCR-7         | <i>CC chemokine receptor 7</i>                                |
| CD3           | <i>Cluster of differentiation 3</i>                           |
| CD4           | <i>Cluster of differentiation 4</i>                           |
| CD8           | <i>Cluster of differentiation 8</i>                           |
| CD11b         | <i>Cluster of differentiation 11b</i>                         |
| CD11c         | <i>Cluster of differentiation 11c</i>                         |
| CD25          | <i>Cluster of differentiation 25</i>                          |
| CD39          | <i>Cluster of differentiation 39</i>                          |
| CD40          | <i>Cluster of differentiation 40</i>                          |
| CD73          | <i>Cluster of differentiation 73</i>                          |
| CD80          | <i>Cluster of differentiation 80</i>                          |
| CD86          | <i>Cluster of differentiation 86</i>                          |
| CFSE          | <i>Carboxyfluorescein succinimidyl ester</i>                  |
| CSFs          | Fatores estimuladores de colônias                             |
| CTLA-4        | Antígeno de célula T citotóxica 4                             |
| CTLs          | Células T citotóxicas   |
| CXCL-12       | <i>CX chemokine ligand 12</i>                                 |
| CXCR-4        | <i>CX chemokine receptor 4</i>                                |
| DCs           | Células dendríticas   |
| EAE           | Encefalomielite experimental autoimune                        |
| EAN           | Neurite experimental autoimune                                |
| EPO           | Eritropoetina   |
| Fas           | <i>Factor Activating exoenzyme S</i>                          |
| Foxp3         | <i>Forkhead box 3</i>   |
| GATA-3        | <i>GATA binding protein 3</i>                                 |
| G-CSF         | Fator estimulador de colônias de granulócitos                 |
| G-CSFR        | Receptor para o fator estimulador de colônias de granulócitos |
| GM-CSF        | Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos    |
| IFN- $\alpha$ | Interferon- $\alpha$  |

|               |   |
|---------------|---|
| IFN- $\gamma$ | Interferon- $\gamma$  |
| IDO           | Indoleamina 2,3-dioxigenase   |
| IgG           | Imunoglobulina G  |
| IL-1          | Interleucina-1  |
| IL-2          | Interleucina-2  |
| IL-2R         | Receptor para interleucina-2  |
| IL-4          | Interleucina-4  |
| IL-6          | Interleucina-6  |
| IL-10         | Interleucina-10   |
| IL-12         | Interleucina-12   |
| IL-13         | Interleucina-13   |
| IL-17A        | Interleucina-17 A   |
| IL-17F        | Interleucina-17 F   |
| IL-18         | Interleucina-18   |
| IL-21         | Interleucina-21   |
| IL-22         | Interleucina-22   |
| IL-23         | Interleucina-23   |
| IL-27         | Interleucina-27   |
| IPEX          | Imunodesregulação, Poliendocrinopatia, Enteropatia, <i>X-linked</i> |
| LGALS1        | Galectina-1   |
| LPS           | Lipopolissacarídeo  |
| M-CSF         | Fator estimulador de colônias de macrófagos                         |
| MHC           | Complexo principal de histocompatibilidade                          |
| MOG           | Glicoproteína de mielina de oligodendrócito                         |
| NK            | Células <i>Natural Killer</i>                                       |
| NO            | Óxido nítrico   |
| NOD           | <i>Non-obese diabetic</i>   |
| pDCs          | Células dendríticas plasmocitóides                                  |
| Ro $\alpha$   | <i>Retinoic orphan receptor <math>\alpha</math></i>                 |
| Ro $\gamma$ t | <i>Retinoic orphan receptor <math>\gamma</math>t</i>                |
| SBG           | Síndrome de Guillain-Barré  |
| SNC           | Sistema nervoso central   |
| SNP           | Sistema nervoso periférico  |
| STAT-1        | Signal transducer and activator of transcription 1                  |
| STAT-3        | Signal transducer and activator of transcription 3                  |
| STAT-5        | Signal transducer and activator of transcription 4                  |
| TNF- $\alpha$ | Fator de necrose tumoral $\alpha$                                   |

|      |  |
|------|--|
| TNFR | Receptor para fator de necrose tumoral |
| Th1  | Linfócitos T <i>helper</i> 1           |
| Th2  | Linfócitos T <i>helper</i> 2           |
| Th3  | Linfócitos T <i>helper</i> 3           |
| Th17 | Linfócitos T <i>helper</i> 17          |
| Tr1  | Linfócitos T reguladores subtipo 1     |
| Treg | Linfócitos T reguladores               |

# SUMÁRIO

|                                  |       |
|----------------------------------|-------|
| RESUMO -----                     | xvi   |
| ABSTRACT -----                   | xviii |
| INTRODUÇÃO -----                 | 1     |
| OBJETIVO -----                   | 27    |
| MATERIAIS E MÉTODOS -----        | 29    |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO -----     | 36    |
| CONCLUSÃO -----                  | 43    |
| FIGURAS E LEGENDAS -----         | 45    |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ----- | 53    |
| ANEXOS -----                     | 90    |

# RESUMOS

A síndrome de Guillain-Barré (SGB) é uma doença inflamatória aguda do sistema nervoso periférico (SNP), com uma considerável morbidade e mortalidade. A Neurite Experimental Autoimune (EAN) é o modelo experimental da síndrome de Guillain-Barré. Trata-se de uma doença inflamatória de caráter autoimune que culmina na desmielinização dos nervos periféricos. A resposta inflamatória na EAN é caracterizada principalmente pela infiltração de células mononucleares, na região endoneural, que liberam citocinas pró-inflamatórias, como IFN- $\gamma$ , IL-17A, TNF- $\alpha$ , entre outras. Desta forma, a modulação da resposta pró-inflamatória pode controlar a evolução da doença.

Durante os últimos anos, os fatores hematopoiético, como a eritropoetina, o GM-CSF e o G-CSF, tem sido bastante usados para modificar a evolução de doenças autoimunes experimentais. Aqui nós administramos o G-CSF em ratos Lewis com EAN induzida. Os nossos resultados sugerem que ele provoca um efeito modulador na resposta imune. O tratamento com G-CSF provocou uma redução significativa dos sinais clínicos da doença, acompanhada do aumento na porcentagem linfócitos T CD4 reguladores (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) e T CD8 reguladores (CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) nos linfonodos, combinado com aumento da expressão de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- $\beta$ ), de Foxp3 e de BDNF, e com diminuição de citocinas e fatores de transcrição pró-inflamatórios (IL-17A, IL-17F, IFN- $\gamma$ , IL-6 e RoR $\gamma$ t, RoR $\alpha$ , respectivamente). O fator hematopoiético G-CSF atua provavelmente sobre o recrutamento e maturação das células dendríticas mielóides, podendo gerar uma população com caráter tolerogênico

em detrimento das DCs imunogênicas. Desta forma, as DCs devem atuar sobre a atividade dos linfócitos T, controlando a resposta autoagressiva, principalmente pela indução de um perfil regulador nessas células. Os linfócitos T reguladores favorecem a liberação de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- $\beta$ , ajudando a inibir a ação de células efetoras Th1 e/ou Th17. Ainda, a expressão aumentada de BDNF sugere que o G-CSF age simultaneamente como um agente anti-inflamatório e neuroprotetor nesse modelo experimental. Assim, a gravidade da EAN é reduzida.

Guillain-Barré syndrome (GBS) is an acute inflammatory disease of the peripheral nervous system (PNS) with considerable morbidity and mortality. The Experimental autoimmune neuritis (EAN) is an experimental model of GBS. It is an autoimmune inflammatory disorder, which results in the demyelination of the peripheral nervous system. The inflammatory response in EAN model is characterized mainly by infiltration of mononuclear cells into the endoneural region and the subsequent release of pro-inflammatory cytokines, such as IFN- $\gamma$ , IL-17A and TNF- $\alpha$ . Therefore, the modulation of the pro-inflammatory response might control the evolution of this autoimmune disease. During the last several years, hematopoietic factors, such as erythropoietin, GM-CSF and G-CSF, have been used successfully to modify experimental autoimmune diseases. Here we have administered the G-CSF to Lewis rats with EAN aiming at verifying the effects of this hematopoietic factor onto the evolution of the disease. Our results suggest that the G-CSF is able to modulate the immune response. The treatment with G-CSF provoked a significant reduction of the EAN clinical signs. This reduction was accompanied by an augmentation of the percentage of regulatory CD4<sup>+</sup> T lymphocytes (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>), and regulatory CD8<sup>+</sup> T lymphocytes (CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) in the lymph nodes. This augmentation of regulatory T cells was combined with an increase of the expression of anti-inflammatory cytokines (IL-10 and TGF- $\beta$ ), Foxp3 and BDNF, as well as a decrease of pro-inflammatory cytokines and transcription factors related with Th1 and Th17 response (IL-17A, IL-17F, IFN- $\gamma$ , IL-6 e RoR $\gamma$ t, RoR $\alpha$ ).

The hematopoietic factor probably acts over the recruitment and maturation of myeloid dendritic cells (DCs) and it might generate a tolerogenic population detrimental to immunogenic DCs. Wherefore, the DCs may be able to act over the activity of T lymphocytes, controlling the auto-aggressive response, mainly by the induction of a regulatory profile on the T cells. The regulatory T cells may favor the release of anti-inflammatory cytokines, such as IL-10 and TGF- $\beta$ , which might help to inhibit the action of effector Th1 and/or Th17 cells. Moreover, the increased expression of BDNF suggests that G-CSF acts simultaneously as an anti-inflammatory and a neuroprotective agent in this experimental model. Thus, the severity of EAN is reduced.

# INTRODUÇÃO

As neuropatias inflamatórias desmielinizantes do sistema nervoso periférico, como a síndrome de Guillain-Barré (SGB) e as polirradiconeurites desmielinizantes periféricas crônicas resultam de resposta imunológica inadequada, dirigida contra os componentes dos nervos periféricos, que levam à interrupção do impulso sensorial ou autônomo, resultando em deficiência transitória [1, 2].

A síndrome de Guillain-Barré continua sendo uma doença das mais fascinantes e desafiadoras para a medicina, apesar do considerável avanço que se teve no tratamento dos pacientes nos último 20 anos. Descrita inicialmente em 1916 por médicos franceses [3, 4] durante a primeira guerra mundial, ela permanece relativamente rara, mas tão marcante em sua apresentação que poucos que a tenham estudado não se lembram de seus sinais clínicos.

Os médicos Guillain, Barré e Strohl descreveram 2 soldados que apresentavam uma doença aguda caracterizada por fraqueza, dor muscular e parestesias. Os pacientes, de 25 e 35 anos de idade, foram examinados a fundo por Guillain, chefe do Centro Neurológico do sexto acampamento do exército francês. Entretanto, a grande inovação nos exames foi feita por Strohl ao investigar o líquido espinhal dos pacientes e realizar testes eletrofisiológicos que apontaram problemas principalmente no reflexo do tendão de Aquiles e no músculo quadríceps. Contudo, o termo síndrome de Guillain-Barré foi usado pela primeira vez apenas em 1927 por Draganesco e Claudian [5], desconsiderando a contribuição dada por Strohl.

A SGB é uma doença monofásica aguda adquirida de caráter autoimune que afeta o sistema nervoso periférico. É geralmente caracterizada por uma rápida paralisia flácida simétrica ascendente decorrente de uma inflamação danosa à bainha de mielina dos nervos periféricos, cranianos, raízes dorsais e ventrais, assim como dos gânglios e das cadeias simpáticas do sistema nervoso autônomo, o que gera uma subsequente perda dos reflexos tendinosos, provocando incapacidade de andar e até mesmo insuficiência respiratória [6, 7]. Apesar da publicação original não ter feito associações da síndrome com infecções, observações clínicas extensivas, apoiadas por estudos epidemiológicos, sugerem que a cerca de 75% dos pacientes apresentam um histórico de sintomas de infecções precedentes aos primeiros sintomas da síndrome [8]. Os sintomas dessas infecções geralmente se manifestam de 3 a 6 semanas antes dos primeiros sinais neurológicos. Supõe-se que os agentes etiológicos dessas infecções prévias possam mimetizar componentes específicos da mielina periférica ou apenas deflagrar uma estimulação anormal ao sistema imunológico [9, 10]. Estudos de casos controlados confirmam a associação relevante com *Campylobacter jejuni* [11], com Citomegalovírus [12] e com Epstein-baar [12]. Também há casos, ainda que menos frequentes, de desenvolvimento da SGB após infecções prévias com Influenza, com HIV e após gravidez [13-18]. Alguns eventos pós-vacinais sugerem que algumas imunizações também parecem agir como ativadores da doença. Um aumento significativo da SGB foi descrito após a vacinação para influenza nos anos de 1976-1977 [19] e após a vacinação para

hepatite [20]. Estudos epidemiológicos sugerem uma incidência de 2 casos a cada 100.000 pessoas no mundo, ligeiramente mais predominante em homens do que em mulheres [21]. A incidência aumenta conforme a idade, apesar de haver um pequeno pico entre adultos jovens [22]. Não há estudos epidemiológicos dessa síndrome no Brasil.

O exame microscópico dos nervos de portadores da SGB revela a infiltração de células mononucleares e a desmielinização segmentar de axônios. O infiltrado se faz, principalmente, às custas de linfócitos e macrófagos. Nas lesões mais graves, ocorre a destruição axonal. Já nas lesões crônicas, observa-se a proliferação das células de Schwann ao longo dos axônios desnudados, como indicativo de possível remielinização [23].

Os pacientes que desenvolvem a síndrome de Guillain-Barré necessitam de cuidados intensivos. Atualmente, os tratamentos são baseados na realização da plasmaferese e de inoculações de imunoglobulinas do isotipo G (IgG) anti-IgG. A plasmaferese purifica o sangue e retira a substância mediadora da neuropatia autoimune, provavelmente anticorpos circulantes, e esse protocolo de tratamento abrevia em torno de um mês o tempo para que o paciente possa voltar a andar sem qualquer tipo de auxílio, quando diagnosticada nos estágios iniciais da doença [24]. Entretanto, apesar do arsenal terapêutico moderno para se tratar o paciente, a taxa de mortalidade varia entre 2 e 12% e cerca de 15% dos pacientes da SGB permanecem com deficiências persistentes mesmo após superar a fase aguda [25]. Inclusive em pacientes que apresentam uma boa

recuperação, comumente verifica-se fraqueza residual e perda de unidades motoras, fato que pode explicar a fadiga apresentada pelos doentes pós-fase aguda [26]. Além disso, cerca de 20-30% dos pacientes apresentam insuficiência respiratória, fazendo-se necessário o uso de respiração mecânica [26-29]. Muitos dos pacientes necessitam de suporte ventilatório prolongado devido à contínua perda da função muscular respiratória e, quando esse quadro é associado a infecções pulmonares, a morbidade e a mortalidade desses pacientes são aumentadas [30, 31].

As evidências relatadas, somadas à frequência com que essas síndromes desmielinizantes surgem depois de infecções ou da administração de algumas vacinas, mostram que a participação do sistema imunológico é inquestionável na doença. Por isso, faz-se necessário o estudo dos mecanismos pelos quais essa síndrome se desenvolve para se tentar preencher as lacunas deixadas pelo atual protocolo de tratamento a partir da associação com novas imunoterapias.

Diversas similaridades clínicas, fisiológicas e histopatológicas fazem da neurite experimental autoimune (EAN), descrita por Waksman e Adams, em 1955 [32], um excelente modelo experimental da SGB. Grande parte do conhecimento que se tem sobre a os mecanismos da SGB proveio de estudos feitos no modelo experimental. A EAN é uma poliradiconeuropatia desmielinizante inflamatória aguda e pode ser induzida em animais geneticamente suscetíveis através da imunização com homogenado de nervo

periférico [33], ou com peptídeos componentes da mielina periférica, P2 [34] ou P0 [35], emulsificados com adjuvante completo de Freund (CFA).

A primeira tentativa bem sucedida de indução da EAN ocorreu em 1955, a partir da imunização de coelhos com a mielina periférica associada ao CFA [32]. Um trabalho posterior dos mesmos autores mostrou a suscetibilidade de outros animais à EAN, como cobaias e algumas linhagens de camundongos [36]. Na década de 80, mostrou-se que ratos Lewis também são suscetíveis à indução da EAN [37]. Esses ratos, quando imunizados com o peptídeo P2, desenvolvem um processo inflamatório que culmina numa desmielinização segmentar bastante intensa e que pode ser comparada ao que ocorre em pacientes com a SGB [38].

Na patogenia do modelo experimental ocorre um fenômeno autoimune monofásico mediado por células [39], e as lesões estão confinadas às raízes nervosas da coluna vertebral, nervos ganglionares e periféricos [40]. Cortes histológicos revelam vários focos de desmielinização e infiltração de macrófagos e linfócitos nos nervos e suas raízes, na região endoneural [41]. Clinicamente, os animais apresentam comprometimento motor causado por perda progressiva do tônus muscular, começando pela cauda, mas podendo chegar à tetraplegia ou, em casos extremos, à morte. Alguns estudos identificaram linfócitos T circulantes capazes de reconhecer o peptídeo P2 e suas sequências neuritogênicas em animais com EAN [37, 42- 45]. Foi sugerida a importância das células T no início da EAN quando se conseguiu induzir a doença em ratos Lewis

sadios a partir da transferência adotiva de células dos linfonodos obtidas de animais que tinham sido ativamente imunizados com P2 [43]. Posteriormente, mostrou-se que apenas a inoculação de linfócitos T CD4 específicos para P2 em ratos Lewis normais produz EAN [46, 47]. Por outro lado, ratos adultos que eram submetidos a cirurgia para retirada do timo eram bem menos suscetíveis à indução ativa da EAN [48, 49].

A fase indutora envolve a apresentação de epítomos neuritogênicos aos linfócitos T CD4<sup>+</sup> principalmente nos linfonodos. Linfócitos T autorreativos precisam ser ativados nos órgãos linfoides periféricos, com uma subsequente expansão e diferenciação dessas células em células efetoras, para poderem atravessar a barreira hematoneural e iniciarem a resposta inflamatória local.

Os processos de rolamento e de transmigração dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> neuritogênicos dependem de uma interação complexa entre moléculas de adesão, quimiocinas e citocinas predominantemente proinflamatórias [50-52]. Os mecanismos pelos quais as células T autorreativas fazem a quebra da barreira hematoneural (BHN) não estão completamente elucidados. Uma vez que esses linfócitos T específicos para o neuroantígeno chegam ao SNP, eles seriam localmente reativadas pelas interações moleculares com as APCs locais e começariam a liberar citocinas, orquestrando a resposta imunológica. As citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  parecem ser particularmente importantes para esse processo [53]. Acredita-se que o IFN- $\gamma$  esteja envolvido no recrutamento celular [54]. Esse microambiente inflamatório atrai mais fagócitos

mononucleares. A desmielinização axonal é iniciada pelos linfócitos T CD4. A ação das T é seguida pela atividade fagocítica de células mononucleares recrutadas, predominantemente macrófagos.

Os macrófagos desempenham um papel chave como APCs e agem como destruidores efetores da bainha de mielina [55, 56]. Ainda não está completamente elucidado se a desmielinização dos nervos periféricos resulta diretamente de efeitos citotóxicos contra a bainha de mielina, provocados por moléculas efetoras solúveis, como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , enzimas proteolíticas, radicais de oxigênio e óxido nítrico (NO) [57], ou se é uma consequência secundária de danos diretos causados às células de Schwann [58].

A EAN foi inicialmente descrita como uma doença mediada por linfócitos Th1 produtores de IL-2 e IFN- $\gamma$  [59]. No entanto, o conceito de que a EAN é mediada exclusivamente por linfócitos Th1 tem sido desafiado. Sugeriu-se a hipótese de que linfócitos do subtipo T *helper* 17 (Th17) efetores sejam importantes para o desenvolvimento desse modelo quando se observou que animais geneticamente deficientes para IFN- $\gamma$ , ou para o receptor dessa citocina, desenvolviam a doença desmielinizante normalmente [60] e que camundongos deficientes para IL-17 desenvolvem alguns modelos de autoimunidades muito tenuamente [61]. Estudos recentes mostraram o importante papel da IL-17 no desenvolvimento da EAN [62]. A diferenciação dos linfócitos *naive* em Th17, caracterizado pela intensa produção e liberação de IL-17, é regulada por uma complexa rede de citocinas. Diferentemente dos

subtipos Th1 e Th2, os quais dependem apenas das suas respectivas citocinas efetoras (IFN- $\gamma$  e IL-4) para a diferenciação, as células Th17 não necessitam de IL-17. Em vez disso, precisam de IL-6 e TGF- $\beta$ , que são duas citocinas com efeitos aparentemente opostos no sistema imunológico. A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória produzida intensamente por células atuantes na resposta imune inata. Portanto, infecções e inflamações locais induzem a produção de grandes quantidades de IL-6 [63]. A IL-6 ativa o STAT-3, que por sua vez aumenta a produção dos fatores de transcrição RoR $\gamma$ t e RoR $\alpha$ , promovendo um aumento na expressão de IL-17A e IL-17F, que parecem aumentar a atividade das células Th17 [64]. O TGF- $\beta$  é considerado uma citocina anti-inflamatória e pode promover a diferenciação de linfócitos T reguladores, que apresentam a capacidade de inibir a resposta inflamatória. Sabe-se que a deficiência de TGF- $\beta$  está associada com o desenvolvimento da doença linfoproliferativa fatal [65]. Juntas, ambas as citocinas, IL-6 e TGF- $\beta$ , podem induzir a diferenciação de linfócitos T *naive* em Th17 [66-69]. Essas citocinas induzem as células T *naive* a secretar IL-21 [67]. Por sua vez, a IL-21 funciona de forma autócrina e aumenta o fator de transcrição da linhagem Th17 RoR $\gamma$ t, aumentando a expressão de IL-17 [70]. A IL-23 atua na expansão e manutenção da população dos linfócitos Th17, contribuindo para o aumento da gravidade de alguns modelos experimentais de doenças autoimunes [67]. Além da IL-6 e TGF- $\beta$ , outras citocinas incluindo a IL-1, IL-13, IL-18, IL-22, IL-23 e TNF- $\alpha$  participam da diferenciação e expansão da Th17 [66]. Por outro lado, alguns estudos demonstraram que citocinas como a IL-4,

IFN- $\gamma$  e IFN- $\alpha$  inibem a expansão das Th17 mediadas pela IL-23 [71]. A IL-27, membro da família IL-12/IL-23, também foi descrita como um potente regulador negativo da diferenciação da Th17 [72].

Na fase de recuperação da EAN foram identificadas citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- $\beta$  [73]. Essas citocinas são produzidas principalmente pelas células T reguladoras. Foi descrita a atuação do TGF- $\beta$  na ativação de células T reguladoras, com consequente redução da gravidade da doença no modelo da encefalomielite experimental autoimune (EAE) [70].

Em 2003, com a identificação do fator de transcrição *forkhead box 3* (Foxp3), o estudo sobre células reguladoras (Treg) teve um considerável avanço. As Treg são indispensáveis para a manutenção da tolerância ao próprio e para homeostase do sistema imunológico [74]. Constituem cerca de 5% das células T periféricas e foram inicialmente identificadas como células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> [75], mas, posteriormente, concluiu-se que elas são melhor caracterizadas pela alta expressão do fator de transcrição Foxp3 [76-79]. Mutações no gene Foxp3 resultam num desenvolvimento defeituoso das células Treg e, portanto, provocam uma desordem autoimune fatal em camundongos e humanos [70, 78, 79]. Pacientes com mutações no gene desenvolvem doenças autoimunes muito cedo, que hoje são coletivamente chamadas de IPEX, caracterizada por disfunção imunológica e pela ausência de células Treg em humanos [80-85]. Da mesma forma, a expressão contínua forçada de Foxp3 por células T CD4<sup>+</sup>

convencionais as confere fenótipo e funções de células T reguladoras [77, 78]. Ainda, a deleção do gene *Foxp3* provoca uma reprogramação das Treg, e elas passam a agir como células T *helper* patogênicas [76]. Esses achados levaram a comunidade científica a considerar o *Foxp3* como um marcador específico de Treg, e ele agiria como um fator diferenciador da linhagem de linfócitos T reguladores [77, 78]. Entretanto, a expressão de *Foxp3* nem sempre resulta na diferenciação de Treg: em humanos, células T ativadas aumentam a expressão de *Foxp3* transientemente sem adquirir fenótipo e função de células reguladoras [87, 88]. Contudo, essa expressão “promíscua” de *Foxp3* até hoje não foi demonstrada em camundongos [77-79]. Juntando-se todas as evidências, células Treg *Foxp3*<sup>+</sup> parecem representar uma linhagem distinta e estável, capaz de manter a expressão de *Foxp3* e suprimir a resposta imunológica, desempenhando um importante papel no processo inibição a ação de células efetoras Th1 e/ou Th17 [89, 90-92], apesar de algumas outras células T reguladoras, como Th3 e T reguladora do tipo 1 (Tr1) poderem também contribuir substancialmente para supressão efetiva da resposta autoimune [93-95]. A expressão estável de *Foxp3* é garantida, pelo menos em parte, por um mecanismo epigenético, chamado demetilação de DNA. A demetilação ocorre em uma das regiões não codantes conservadas do gene *Foxp3*, denominada *região de demetilação específica de células Treg* [91, 96, 97]. Sabe-se que linfócitos T reguladores *Foxp3*<sup>+</sup> utilizam o TCR $\alpha\beta$  para reconhecimento do antígeno, possuem um vasto repertório comparável em tamanho, apesar de muito diferente na sua composição, com

o repertório das células T CD4<sup>+</sup> convencionais e possuem também moléculas MHC de classe II bastante restritas [98, 99].

Acredita-se que a geração de Treg ocorra primariamente no timo, como resultado de uma interação de alta afinidade entre o TCR e os autoantígenos [100, 101]. Entretanto, algumas células Treg Foxp3<sup>+</sup> podem também se diferenciar extratimicamente a partir de linfócitos T CD4<sup>+</sup> *naive*, após o reconhecimento do antígeno em um microambiente “tolerogênico” *in vivo* [102, 103] ou na presença de TGF- $\beta$  *in vitro* [104]. Curiosamente, tem sido descritas ligações entre Tregs e células Th17. Como dito anteriormente, foi demonstrado *in vitro* que, se a ativação das células T ocorrer na presença de TGF- $\beta$ , o resultado poderá ser a geração de Treg Foxp3<sup>+</sup>. Entretanto, a combinação de IL-6 e TGF- $\beta$  promove a geração de células Th17 [67]. Ainda, um outro estudo mostrou que os produtos do gene Foxp3 podem interagir diretamente com fatores de transcrição que determinam uma resposta pró-inflamatória (Th1 T-bet e Th17 RoR $\gamma$ t e RoR $\alpha$ ) [105]. Essas descobertas sugerem que o balanço entre TGF- $\beta$  e IL-6, provavelmente, determina a diferenciação de uma célula T em Treg ou Th17, através da competição antagonista de Foxp3 e RoR $\gamma$ t / RoR $\alpha$ . Desta forma, a inibição desses fatores de transcrição relacionados com a diferenciação de células T em Th17, além de favorecer a liberação de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, IL-4 e TGF- $\beta$  [105], diminui a resposta pró-inflamatória.

Sob uma perspectiva funcional, pode-se agrupar em 4 “modos de ação” básicos os mecanismos de supressão usados pelas Treg: 1) por citocinas inibidoras; 2) por citólise;

3) por perturbação metabólica; 4) por modulação da maturação e da função das células dendríticas (DCs).

Citocinas inibitórias tem sido o foco de uma parte considerável da atenção que se tem dado à capacidade supressora das Treg. Estudos realizados com alguns modelos de alergia e asma sugerem que tanto Treg geradas no timo quanto as induzidas na periferia são dependentes de IL-10 [106], e alguns autores reportaram que essas células dependem de ambas as citocinas, IL-10 e TGF- $\beta$  [107], e elas seriam capazes de produzi-las intensamente [108]. Essas citocinas anti-inflamatórias poderiam ter uma ação parácrina, promovendo a manutenção do microambiente anti-inflamatório. Dessa forma, os linfócitos T reguladores conseguiriam amplificar a resposta reguladora / anti-inflamatória ao mesmo tempo em que são capazes de diminuir competitivamente o ritmo da diferenciação das células T *naive* em T *helper* patogênicas [106, 107].

Por um longo tempo, considerou-se que apenas as células *Natural Killer* (NK) e os linfócitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos (CTLs) eram capazes de promover a citólise através da secreção de granzimas [109]. Sabe-se que células T CD4<sup>+</sup> convencionais não são citolíticas. Por isso foi surpreendente quando se mostrou que a expressão de granzima-B é aumentada em Treg murinas [110, 111]. Gondek e colaboradores foram os primeiros a mostrar que camundongos com Treg deficientes para granzima-B tiveram a capacidade supressora reduzida *in vitro* [112]. A ideia de que as Treg possuem atividade citolítica é corroborada por estudos mostrando que essas células reguladoras podem matar

linfócitos B por um mecanismo dependente de granzima-B [113]. Apesar da maioria dos estudos sobre a citotoxicidade das Treg focar mecanismos envolvendo granzima-B, um trabalho recente sugeriu que células T reguladoras ativadas induzem apoptose de células T efetoras através da via envolvendo o TRAIL-DR5 (*tumour-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand–death receptor 5*) [114]. Outro estudo mostrou que células T reguladoras murinas e humanas tem a expressão de Galectina-1 (também conhecida como LGALS1) aumentada, molécula que pode induzir apoptose em células T convencionais e, ainda mais, mostraram também que Treg deficientes para a molécula tem atividade citotóxica reduzida *in vitro* [115]. Interessantemente, um estudo preocupado com o destino das células neuritogênicas infiltradas nos nervos no período de recuperação, no modelo de EAN, revelou que cerca de 19% delas são eliminadas apoptoticamente por mecanismos de defesa locais [116]. Apesar de o autor não investigar a participação dos linfócitos reguladores nesse processo de eliminação de células infiltradas, a ideia de que as Treg possam ser importantes para ele é plausível, visto que já se sabe que células reguladoras Foxp3<sup>+</sup> estão ativadas na fase de recuperação da EAN [73].

Recentemente, tem sido descritos muitos mecanismos supressivos intrigantes que podem ser coletivamente chamados de mecanismos mediadores da “perturbação metabólica” de células T efetoras. Sabe-se que os linfócitos reguladores são incapazes de produzir IL-2, porém dependem dela para sobreviver. Muito já se discutiu se a alta

expressão de CD25 por células reguladoras aumentaria a poder de “consumo” de IL-2 por parte delas. Dessa forma, elas seriam capazes de fazer inibição da proliferação de células T *helper* ativadas a partir da competição por IL-2 disponível no meio [117, 118]. Entretanto, recentemente, tem se proposto dois novos mecanismos de células reguladoras para se induzir a liberação intra ou extracelular de nucleosídeos adenosina. A expressão de CD39 e CD73 parece potencializar a produção de adenosina pericelular, molécula que suprime a função de células T efetoras através da ligação com o receptor para adenosina 2A (A2AR) [119-121]. Curiosamente, a ligação da adenosina ao A2AR interfere nas funções de células T efetoras, mas também parece aumentar a geração de Treg a partir da inibição da expressão de IL-6 e a promoção da expressão e secreção de TGF- $\beta$  [122]. Os autores também mostram que a adenosina pode modular a maturação das células dendríticas a favor de um fenótipo tolerogênico [123]. Ainda, os linfócitos T reguladores podem também suprimir funções de células T efetoras a partir da transferência direta do segundo mensageiro cíclico adenosina monofosfato (cAMP), que é um potente inibidor, para o interior de células T efetoras através de junções comunicantes de membrana [124].

As ações das células T reguladoras parecem não se restringir a apenas outros linfócitos. Alguns estudos tem sugerido que elas podem modular a maturação e/ou função das DCs, as quais são necessárias para a ativação das células T efetoras. Contudo, apesar dessa ideia ser bastante atrativa, os dados que a apoiam ainda são bastante

limitados [125]. As DCs são células apresentadoras de antígeno (APCs) altamente especializadas e possuem uma capacidade única de ativar completamente linfócitos T e induzi-los à expansão clonal, tanto os *naive* quanto os de memória. Diferentes subtipos de DCs tem sido descritos, conforme a habilidade delas de induzir a diferenciação de células T *naive* em Th1, Th17, Th2 ou Treg. As chamadas de DCs imunogênicas, marcadas pela expressão apenas de CD11c, seriam maduras o suficiente para ativar plenamente os linfócitos T, induzindo-os a um fenótipo imunogênico inflamatório, caracterizado pela produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- $\gamma$  e IL-2, no caso das Th1, e IL-17A, IL-17F e TNF- $\alpha$ , no caso das Th17, entre outras citocinas. Por outro lado, as DCs tolerogênicas, fenotipicamente identificadas por serem CD11b<sup>+</sup> ou CD11b<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup>, estariam em um estado de maturação menos avançado, o que lhes conferiria uma menor capacidade de ativar linfócitos T *naive*, resultando na diferenciação desses linfócitos no subtipo Th2, caracterizado pela expressão de citocinas anti-inflamatórias, como IL-4 e IL-10 [126], ou Treg [127].

Alguns estudos que utilizaram microscopia intravital revelaram interações diretas entre Treg e DCs *in vivo* [128, 129]. Foi proposto que essas interações serviriam para atenuar a ativação de células T efetoras num processo envolvendo a molécula coestimulatória CTLA-4, a qual é constitutivamente expressada por Treg [75, 130]. Mais especificamente, o bloqueio de CTLA-4 com anticorpos monoclonais específicos mostrou que a supressão de células T efectoras via DCs mediadas por Treg é reduzida [129, 130].

Outro dado importante é o fato de células T reguladoras poderem condicionar as DCs a expressarem indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), uma enzima capaz de induzir a produção de metabólitos proapoptóticos a partir do catabolismo do triptofano, resultando na supressão de células T efetoras através de um mecanismo dependente de interações entre CTLA-4 e CD80 e/ou CD86 [131, 132]. Ivars e colaboradores demonstraram que as Treg teriam a capacidade de regular negativamente a expressão de moléculas coestimulatórias CD80 e CD86 *in vitro* [133]. Estudos feitos com Treg humanas indicam que essas células podem modular a função de monócitos e macrófagos [130, 134, 135]. Apesar dos mecanismos pelos quais esse processo acontece ainda não estarem bem elucidados, os autores sugerem que essa modulação ocorreria através de moléculas como o CTLA-4 e a liberação de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 e o TGF- $\beta$ .

A maior parte dos estudos sobre linfócitos T com função regulador focam os linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Entretanto, ultimamente tem se descrito linfócitos T reguladores que são CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>, e são chamados de T CD8<sup>+</sup> reguladores (T CD8<sup>+</sup> reg). Semelhantemente às T CD4<sup>+</sup> reguladoras, essas células também podem ser Foxp3<sup>+</sup>. Os mecanismos de regulação da resposta imunológica se dá através de vários mecanismos, incluindo a liberação de IL-10 e de TGF-  $\beta$ , e por interação molecular envolvendo CTLA-4 [136-138].

Tendo em vista a vasta gama de mecanismos pelos quais as células T reguladoras poderiam regular a resposta imunológica, muito tem sido feito na tentativa de se

manipular o sistema imunológico para tentar ativar células com funções reguladoras, no sentido de diminuir os danos causados pelas reações autoagressivas. Em 2011, um trabalho de Farias e colaboradores, realizado em nosso laboratório, mostrou que infecção com *Plasmodium chabaudi* estimula a formação de Treg e reduz a gravidade da EAE em camundongos C57BL/6 [89]. Outro estudo do mesmo autor, publicado em 2013, mostrou que tratamento via oral com Vitamina D3 também é capaz de induzir a formação de Treg e diminuir a gravidade da EAE em ratos Lewis [139]. Nesse mesmo sentido, há muitos estudos que visam manipular o sistema imune a partir do uso de fatores hematopoiéticos, que são coletivamente chamados de fatores estimuladores de colônias (CSF), como a eritropoetina (EPO), o fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), o fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) e o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF).

Esses fatores hematopoiéticos chamaram a atenção da comunidade científica inicialmente por sua habilidade de gerar *in vitro* colônias de células mielóides [140-147] a partir do precursor da medula óssea e promover proliferação e diferenciação dessas células [140, 146-149]. Entretanto, posteriormente, ficou muito claro que os CSFs podem também agir sobre células mielóides maduras *in vitro* e, portanto, foi sugerido que eles pudessem desempenhar papéis muito mais amplos na resposta imunológica do que simplesmente como fatores de crescimento hematopoiéticos [140, 150-152]. Em geral, os CSFs são polifuncionais e seus efeitos sobre as células do sistema imune podem ser

agrupados em 3 categorias: 1) Aumento da sobrevivência e/ou proliferação celular; 2) Diferenciação celular; 3) Ativação celular [140].

A eritropoetina (EPO) é uma glicoproteína responsável pela manutenção do número de células sanguíneas vermelhas [153-156]. Vários estudos mostram que a EPO pode agir como um imunomodulador e tem a capacidade de melhorar diversos tipos de inflamação, incluindo doenças autoimunes órgão-específicas [153], isquemia cerebral [153, 157, 158] e lesões na medula espinhal [159, 160]. A administração de EPO a camundongos com EAE [160-162] e a ratos Lewis com EAN [163, 164], após a imunização com os respectivos neuroantígenos, resultou numa supressão significativa da proliferação das células T autorreativas. Ainda, o tratamento *in vivo* com EPO em ratos com EAN demonstrou a indução da liberação da citocina anti-inflamatória TGF- $\beta$  [163].

O GM-CSF é usado clinicamente para aumentar o número de neutrófilos após tratamento com quimioterápicos e transplantes de medula óssea [164]. Contudo, trabalhos recentes mostram que o GM-CSF parece ser a arma secreta do arsenal das células Th17. Esses trabalhos mostram, no modelo de EAE, que o GM-CSF é crítico para as funções proinflamatórias das Th17 [165, 166]. Um estudo identificou a IL-23 como um fator de estimulação à produção de GM-CSF [167]. Os autores acreditam que a IL-23 promova a produção de GM-CSF por células T e que esse fator hematopoiético seja essencial para as Th17 orquestrarem a inflamação no sistema nervoso central. Os linfócitos T *helper* 17 produzem uma série de citocinas, como IL-17A, IL-17F, IL-22 e TNF-

$\alpha$ , mas o bloqueio isolado de IL-17A já se mostrou pouco eficaz na redução da gravidade de modelos de doenças autoimunes [167]. Da mesma forma, o bloqueio de IL-17F, IL-22 e TNF- $\alpha$  produziu efeitos variáveis, dependendo do modelo de doença [167]. Mas um achado consistente foi que a neutralização de IL-23 efetivamente abortou a resposta efetora em praticamente todos os modelos testados até agora [167, 168].

Baseados na habilidade dos CSFs de regular o número de células mielóides e de induzir mais populações de células maduras a produzirem mediadores próinflamatórios, e no fato de que a produção CSFs é aumentada em um grande número de populações celulares após o estímulo por IL-1 e TNF- $\alpha$ , foi proposto que o GM-CSF e o M-CSF façam parte de uma rede de citocinas que permite a comunicação entre células mielóides e as células da vizinhança, durante as reações inflamatórias [169-173]. Essa rede de CSFs pode explicar, pelo menos em partes, a natureza de certas lesões inflamatórias crônicas, como, por exemplo, articulações sinoviais reumatoides, devido à sobrevivência de macrófagos e granulócitos aumentada dependente de CSFs, levando ao maior número dessas células nas lesões [169, 172]. A confirmação de que a depleção do GM-CSF e do M-CSF têm efeitos terapêuticos benéficos nas autoimunidades veio de um estudo no modelo de artrite em camundongos [174-176]. No modelo de artrite colágeno-induzido, os camundongos deficientes para GM-CSF não desenvolveram a doença, apesar de apresentarem uma resposta humoral normal contra colágeno do tipo II [175].

Controversamente, camundongos submetidos à administração de GM-CSF foram protegidos contra o desenvolvimento de diabetes do tipo I [177].

O fator estimulador de colônias de granulócitos, o G-CSF, foi inicialmente descrito como um fator de crescimento para os neutrófilos [178]. Trata-se de uma glicoproteína de 19.6 kDa codificada em humanos no cromossomo 17 q11-22. O efeito primário do G-CSF sobre as células do sistema hematopoiético consiste na estimulação da proliferação e diferenciação das células progenitoras normais, na reconstituição dos neutrófilos após a mielossupressão, causada pelas rádio e quimioterapias, e na mobilização dos leucócitos da medula óssea para o *pool* periférico [179]. Trabalhos recentes sugerem que o G-CSF pode interagir com o sistema imune alterando a reatividade dos linfócitos e modificando a função das células apresentadoras de antígeno [178, 180]. A expressão dos receptores de G-CSF (G-CSFR) foi demonstrada em linfócitos T ativados, mas não em repouso [181]. Apesar de expressão desses receptores ser significativamente maior em neutrófilos do que em outros tipos celulares, é provável que a participação dessa citocina seja mais relevante nas inflamações e autoimunidades do que nos sinais para atrair os neutrófilos [182]. Ainda que o GM-CSF e o G-CSF tenham sido ambos agrupados na mesma família, a família dos CSFs, seus efeitos parecem ser semelhantes apenas no que se refere à mobilização celular mielóide. Diversas evidências sugerem que suas ações nos processos inflamatórios são bastante distintas.

O G-CSF ativa genes com função imunorreguladora em linfócitos T, como GATA-3 e STAT-5, e inibe diretamente a produção de citocinas pró-inflamatórias, quando administrado em doses farmacológicas [182, 183]. Estudos mostraram que ele modifica a produção de citocinas de células do sistema imunológico *ex vivo*. Especificamente, o G-CSF atenuou a produção de IL-1, IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  por células estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS) [184, 185]. Outro estudo tratou previamente com G-CSF voluntários saudáveis, que receberam posteriormente endotoxina da *Salmonella abortus equi*. Esse trabalho revelou que os níveis de receptores para TNF (TNFR) e IL-1 aumentaram comparados com grupo controle, isto é, o grupo não tratado com o fator hematopoiético, sugerindo que o G-CSF pode ter um efeito anti-inflamatório *in vivo* [184-186].

Há uma série de estudos relativos aos efeitos desse CSF sobre as funções dos linfócitos T. Verificou-se que a administração de G-CSF em indivíduos saudáveis inibe a proliferação de células T em resposta a mitógenos [187-191] através da liberação de fatores inibidores solúveis [187-189, 192]. Células precursoras de monócitos, mobilizadas para o sangue periférico pelo G-CSF, provavelmente inibem as funções das células T CD4<sup>+</sup> por induzir a apoptose através da interação das moléculas Fas-Fas ligante [193], e células de origem monocítica podem interferir na expressão da cadeia  $\zeta$  da molécula CD3 de linfócitos T, contribuindo para uma posterior disfunção dessas células [194, 195]. Sabe-se que o G-CSF é capaz de mobilizar linfócitos T reguladores CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> da

medula óssea para a periferia, assim como faz com células T naturais supressoras CD4<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>TCRαβ<sup>+</sup> [196, 197]. Essa mobilização se faz pela redução da expressão CXCL-12 na medula óssea, um ligante de CXCR-4, o que favorece a saída de células Treg [196, 197]. Em humanos, foi demonstrado que a administração de G-CSF aumenta a mobilização de células dendríticas plasmocitóides, produtoras de IFN do tipo I [198]. Estudos experimentais mostraram que a administração *in vivo* de G-CSF em camundongos ativa a população de linfócitos reguladores produtores de IL-10 e induz tolerância imunológica aos transplantes [199]. Outros estudos feitos em indivíduos controles sadios revelou que o G-CSF pode mobilizar DCs imaturas que, por sua vez, puderam induzir células T *naive* alogênicas a produzirem IL-4 e IL-10 [200-202]. A administração de G-CSF regula positivamente a expressão de CCR-7 por DCs do sangue periférico e, portanto, modifica o padrão migratório dessas células [198].

Na luz dos resultados obtidos referentes à habilidade do G-CSF de gerar DCs tolerogênicas e diferenciar linfócitos T *naive* em Treg ou Th2, vários outros estudos visaram avaliar o potencial terapêutico desse fator hematopoiético em modelos de doenças autoimunes. O G-CSF desempenhou papéis contrastantes entre doenças autoimunes humorais e celulares.

No modelo de lúpus eritematoso, desenvolvido em camundongos, um tratamento crônico com uma pequena dose de G-CSF (10 µg/kg) acelerou a doença, mesmo tendo sido observada uma diminuição da produção de IFN-γ e TNF-α [203]. Essa

piora na doença pode ser resultado da grande habilidade do G-CSF de aumentar a produção de IFN- $\alpha$  [201] e de estimular linfócitos B a se diferenciarem em plasmócitos [204], culminando na maior produção de autoanticorpos e no subsequente desenvolvimento do lúpus [205-207]. Por outro lado, o estágio final da doença de lúpus, caracterizado por uma intensa inflamação nos rins, a nefrite, foi prevenida em camundongos com uma dose de 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  [203].

Alguns estudos demonstraram que a administração exógena de G-CSF exacerbou o modelo de artrite induzida por colágeno em murinos [208, 209]. Foi sugerido que o efeito deletério do tratamento estava relacionado com a mobilização, migração e expansão de células mielóides para a periferia, que podem intensificar a inflamação em articulações. Por outro lado, outros autores mostraram um efeito benéfico da administração de G-CSF em ratos com artrite [174].

Diferentemente dos resultados obtidos em modelos de doenças autoimunes humorais, os estudos que trataram com G-CSF modelos de autoimunidades mediadas por células apresentaram resultados coerentes entre si. Trabalhos no modelo de EAE e diabetes do tipo I autoimune impulsionaram o interesse da comunidade científica em se transformar o G-CSF em potenciais novas estratégias terapêuticas.

No modelo de diabetes tipo I autoimune, desenvolvida em camundongos NOD, foi demonstrado que o tratamento com G-CSF resultou na proteção contra a doença e a insulite destrutiva [182]. Os bons resultados foram correlacionados ao recrutamento de

DCs plasmocitóides (pDCs) e Treg. Essas pDCs apresentaram um fenótipo imaturo, com redução da expressão de MHC de classe II e de CD80, mas não modificou os níveis de CD86 e CD40.

Estudos feitos no modelo de EAE revelaram que um curto tratamento de 7 dias, com uma dose de 200 µg/Kg, iniciada no primeiro dia em que os animais apresentaram os primeiros sinais clínicos, conferiu uma proteção prolongada contra a evolução da doença [210]. Os animais apresentaram um processo desmielinizante limitado e uma infiltração discreta no SNC de células T encefalitogênicas. Houve uma redução significativa da expressão de TNF- $\alpha$ . O efeito protetor foi confirmado em camundongos C57BL/6 imunizados com peptídeo MOG [211]. Os mesmos autores mostraram níveis elevados da expressão de G-CSF em lesões cerebrais de pacientes na fase aguda de esclerose múltipla, o que sugere um papel de proteção endógena desse fator hematopoiético [211]. Trabalhos recentes demonstrando a capacidade do G-CSF de agir em casos de degeneração neuronal e estimular a neurogênese em casos de isquemia aguda encorajaram estudos para se avaliar o G-CSF como um tratamento para derrames e doenças autoimunes e degenerativas do SNC [212].

Ainda não há estudos dos efeitos da aplicação do G-CSF no modelo da EAN. Entretanto, de posse de todos os trabalhos citados, que trazem evidências da grande capacidade desse fator de modular o sistema imunológico, a ideia de se tratar animais com G-CSF emerge como um tratamento promissor para esta doença desmielinizante

do SNP. Tendo isso em vista, no presente estudo, nós tentamos entender um pouco dos efeitos do G-CSF sobre os mecanismos efetores e imunorreguladores da EAN.

# OBJETIVO

Avaliar o efeito da administração do G-CSF nos mecanismos efetores e imunorreguladores na Neurite Experimental Autoimune induzida em ratos Lewis

# MATERIAS E MÉTODOS

## ANIMAIS

Ratos Lewis, de 6 a 8 semanas, fêmeas, obtidos do Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA) e estabelecidos como colônia Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/UNICAMP), aonde foram abrigados em condições livres de patógenos. Durante a fase de experimentação, os animais foram mantidos no biotério de manutenção do departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, bloco F, do Instituto de Biologia da UNICAMP, também em condições livres de patógenos. Os animais tiveram acesso *ad libitum* a água e ração específica para roedores (NUVITAL) durante todo o período. Foram confinados a uma temperatura entre 21° e 23°C e a um ciclo de 12 horas com luz e 12 horas no escuro. Os animais tinham idade adequada para os experimentos e foram randomicamente distribuídos entre os grupos tratados e controles. Todos os procedimentos foram feitos de acordo com as regras e instruções propostas pelo Conselho brasileiro de uso de animais e aprovado pelo Comitê de ética de experimentação animal da universidade (CEUA/UNICAMP 2035-1).

## NEUROANTÍGENOS

A EAN foi induzida com o peptídeo da fração P2 da mielina periférica. O peptídeo P2<sub>53-78</sub> (GENEMED SYNTHESIS, CA, USA) apresenta a seguinte sequência de aminoácidos: TESPfKNTEISfKLGQEFfTTADNR.

## INDUÇÃO DE EAN

Cada animal recebeu 150 µg do peptídeo de P2 em 100 µl de PBS, em emulsão com igual volume de Adjuvante Completo de Freund enriquecido com 300 µg *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (Difco, Detroit, MI, USA), inoculada nas patas traseiras por via subcutânea.

## TRATAMENTO

Tratamento com 5 doses consecutivas diárias (100 µg/Kg/dose ou 200 µg/Kg/dose) de G-CSF (Filgrastim - BERGAMO), em volume final de 100µl, por animal, injetadas intraperitonealmente. A primeira aplicação ocorreu no dia 0 após a imunização. O grupo controle recebeu igual volume de salina (PBS) estéril.

## EVOLUÇÃO CLÍNICA DA EAN

Os ratos foram observados diariamente, a partir do nono dia após a imunização, para se avaliar os sinais clínicos da EAN. Atribuiu-se "scores" clínicos a cada animal do grupo (n=20). Conforme proposto por Stienekemeier e colaboradores, 2001 [213], a avaliação da evolução clínica foi graduada da seguinte forma: grau 0 = não doente; grau 1= fraqueza muscular leve na cauda; grau 2= fraqueza muscular moderada na cauda; grau 3= cauda sem tônus; grau 4 = andar descoordenado; grau 5: paraparesia leve; grau 6: paraparesia moderada; grau 7: Paraparesia grave ou paraplegia; grau 8: tetraparesia

grave; grau 9: tetraplegia / moribundo; grau 10: morte. As observações se seguiram por 30 dias.

### *PERFUSÃO DO ANIMAL E CORTES HISTOLÓGICOS*

O animal, após a anestesia, foi perfundido com glutaraldeído a 2,5 %, utilizando-se bomba de perfusão. Os nervos ciáticos de ratos Lewis normais ou imunizados com o peptídeo de P2, submetidos ou não ao tratamento com G-CSF, foi individualizado 15 dias após a imunização sobre microscopia cirúrgica apropriada, após fixação com glutaraldeído (24 horas) seguido de imersão em sacarose a 30 %. Após esse tratamento, parte do nervo foi congelada e cortou-se secções de 10 micrometros em micrótomo comum, criostato, e corados com Luxol Fast Blue e contra corados com Cresil Violet. As imagens foram feitas utilizando-se lentes objetivas com aumento de 8x e 40x.

### *OBTENÇÃO DAS CÉLULAS DE BAÇO E LINFONODO*

Baços e linfonodos foram removidos assepticamente e suspensões de células foram preparadas usando-se uma malha de inox. Após a primeira centrifugação, o botão celular foi tratado com tampão de lise para eliminação das hemácias. As células foram lavadas 3 vezes em solução balanceada de Hank's e ressuspendidas em meio RPMI 1640, enriquecido com Soro Fetal Bovino (CULTLAB – SP – BRASIL) a 5% e gentamicina (4,25

mg/L). Para determinação da viabilidade celular, utilizou-se o método de exclusão com Azul de Trypan.

### *PREPARAÇÃO DE LINHAGENS NEURITOGÊNICAS*

Animais imunizados com neuroantígeno conforme descrito anteriormente tiveram os linfonodos poplíteos e inguinais removidos 10 dias após a imunização. A concentração celular foi ajustada para  $2 \times 10^5$  por poço em placa de 96 poços e cultivadas com RPMI 1% soro de rato 1%, gentamicina e 5  $\mu\text{g/ml}$  de P2 por 2 dias e meio, na presença do neuroantígeno. Após esse tempo, 50% do meio foi removido e acrescentou-se meio de crescimento: RPMI 10% soro bovino fetal, 400UI/mL de IL-2 (PROLEUKIN) e sobrenadante de cultura de esplenócitos estimulados com concanavalina-A (SIGMA – EUA). As células foram cultivadas por mais 5 dias e então foi feito o primeiro re-estímulo. No sétimo dia após a imunização, foram adicionadas APCs provenientes do timo, previamente irradiadas (2.500 rad), e novamente as células foram cultivadas em meio contendo o neuroantígeno, recomeçando o processo de estimulação linfocitária. Esse ciclo se repetiu até o segundo dia após o terceiro re-estímulo, quando, para a indução passiva da EAN,  $5 \times 10^6$  células foram injetadas por via intravenosa, e os animais foram avaliados diariamente.

## RESPOSTA PROLIFERATIVA DE LINFÓCITOS

A avaliação da resposta proliferativa de linfócitos a mitógenos específicos foi feita com células provenientes de linfonodos. As células foram removidas 10 dias após a imunização, lavadas duas vezes com solução balanceada de Hank's e ressuspendidas em meio de cultura (RPMI-1640) com  $\beta$ -Mercaptoetanol, antibióticos e 5% de soro fetal bovino inativado por incubação e banho (55°C). As células dos linfonodos foram estimuladas com 5  $\mu$ g/ml do peptídeo P2. O ensaio utilizado foi marcação com CFSE. A aquisição foi feita em citômetro de fluxo Gallios® (BECKMAN COULTER). As análises foram feitas usando software ModFit LT™.

## CITOMETRIA DE FLUXO

As células foram incubadas com anticorpos contendo fluorocromos (CD4-FITC, CD8-FITC, CD25-PE e Foxp3-APC) por 1h em PBS 1% de SBF. Após a incubação, as células foram lavadas 3 vezes com PBS. Quando necessário (marcação com anti-Foxp3) tampão de permeabilização (PBS 1% de soro autólogo, 0,01% de Tween-20) foi utilizado *overnight*. A aquisição foi feita em citômetro de fluxo Gallios® (BECKMAN COULTER). As análises foram feitas usando software KALUZA®.

## REAL TIME PCR

As amostras de baço e linfonodo foram colocadas em TRIzol (INVITROGEN) e congeladas para posterior extração do mRNA. As amostras de nervo ciático foram colocadas em tampão de lise do kit RNAeasy (QIAGEN) adicionado de 1% de  $\beta$ -mercaptoetanol, e trituradas com auxílio de um minipolitrón.

O mRNA extraído de todas as amostras foi convertido a cDNA usando-se o kit de conversão *High Capacity cDNA* (APPLIED BIOSYSTEMS), de acordo com as instruções do fabricante. Os cDNAs foram colocados junto a conjuntos de primers e sonda marcada com FAM-MGB (IL-10, TGF- $\beta$ , IL-17A, IL-17F, IL-6, RoR $\alpha$ , RoR $\gamma$ t, Tbx-21, IFN $\gamma$ , Foxp3, STAT-1) e *master mix* (APPLIED BIOSYSTEMS). As análises foram feitas usando *Real-time PCR system 7500 fast* (APPLIED BIOSYSTEMS). Os ciclos e as temperaturas, já determinadas pelo fabricante, são os seguintes: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, e 45 ciclos de 15 segundos a 95°C/1 minuto a 60°C.

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

A significância estatística foi determinada usando testes não paramétricos, pois os dados não atendiam as exigências para o uso de testes paramétricos (dados contínuos, distribuição normal, variância, tamanho da amostra e etc.) e Teste U (Mann-Whitney). O valor de  $p$  menor que 0.05 foi considerado significativo. Todas as análises foram realizadas no programa Bioestat 5.0.

# RESULTADOS E DISCUSSÃO

### *TRATAMENTO COM G-CSF*

A EAN foi ativamente induzida em ratos Lewis, a partir da imunização com o peptídeo P2 emulsificado em CFA. O G-CSF foi administrado em duas diferentes doses, 100 e 200 µg/Kg/dose, durante 5 dias consecutivos (0-4 dias após a imunização (d.a.i)). Ambos os tratamentos induziram uma redução significativa dos sinais clínicos da EAN em relação ao grupo controle com EAN não tratado (Fig. 1A). Chegamos a tratar com uma dose de 500 µg/Kg/dose (resultados não apresentados) e houve melhora na gravidade da EAN. Entretanto, a melhora não foi significativa em relação a verificada quando tratamos com 200 µg/Kg/dose, e os animais apresentaram diarreia como efeito colateral. Portanto, a dose de 200 µg/Kg/dose foi definida como dose ótima para todos os experimentos subsequentes. Os resultados mostram um efeito benéfico do G-CSF na evolução da EAN quando se faz um breve tratamento.

### *SUPRESSÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA*

O desenvolvimento da EAN é caracterizada pela sensibilização e ativação de células T neuritogênicas nos órgãos periféricos do sistema imune. Essas células migram para os nervos periféricos e liberam mediadores inflamatórios, os quais podem contribuir direta ou indiretamente para a destruição da bainha de mielina.

Nós observamos uma redução significativa da resposta proliferativa de linfócitos T de ratos Lewis com EAN tratados com G-CSF em relação à resposta proliferativa

apresentada pelas células dos animais controles (Fig. 1B). Ainda, o tratamento com G-CSF reduziu a infiltração de células mononucleares dentro dos nervos ciáticos (Fig. 1C). Esse resultado indica que o tratamento com o G-CSF poderia interferir na ativação das células neuritogênicas e/ou na migração dessas células para o nervo periférico. Desta forma, seria plausível que o G-CSF agisse na indução de células T reguladoras. Essas células podem diminuir a resposta pró-inflamatória e, assim, reduzir a ativação das células autoagressivas [70]. Por isso, verificamos a expressão de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- $\beta$ ) e de Foxp3 no nervo ciático e nos linfonodos dos animais tratados e dos não tratados com o G-CSF. Nossos resultados demonstraram que a expressão de IL-10, TGF- $\beta$  e Foxp3 não está significativamente alterada entre os grupos controle e tratado nos nervos ciáticos (Fig. 1D). No entanto, nós observamos que os animais tratados com 200  $\mu$ g/Kg/dose tiveram uma maior porcentagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> nos linfonodos (19.5%) comparados com o grupo controle (8.2%) (Fig. 2A-B). Também constatamos que o tratamento com o G-CSF elevou a expressão de Foxp3 em células T CD8<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (Fig. 2C-D). Esses resultados indicam que o tratamento com G-CSF aumenta direta ou indiretamente a expressão de Foxp3 em linfócitos T (Fig. 2E) e estão em concordância com a literatura, uma vez que as células T reguladoras, apesar de terem a capacidade de infiltrar no nervo junto com as células autoagressivas, provavelmente agem com maior intensidade na periferia [70].

Células T reguladoras suprimem a ativação do sistema imunológico e, dessa forma, previnem inflamação excessiva e/ou de caráter autoimune [73, 89, 214]. O aumento na proporção de linfócitos T reguladores parece ser responsável, pelo menos em partes, pela supressão da resposta inflamatória observada nos animais tratados. Entretanto, o tratamento com 100 µg/Kg/dose também provocou uma redução na gravidade da EAN (Fig. 1A), mas não induziu aumento no significativo do percentual de células T reguladoras (dados não apresentados). Portanto, provavelmente, há outros fatores ainda não explorados envolvidos na melhora clínica observada.

#### *PERFIL DE EXPRESSÃO DE CITOCINAS*

A resposta autoagressiva na EAN é caracterizada pela expressão e liberação de citocinas de células Th1 e/ou Th17. Portanto, nós avaliamos a expressão de citocinas de células e fatores de transcrição de Th1 e Th17 em linfonodos 10 dias após a imunização, período o qual é anterior à migração das células neuritogênicas da periferia para o tecido alvo. Nós observamos uma regulação negativa consistente na expressão de fatores de transcrição de células Th1 (T-bet) e de Th17 (RoR $\alpha$  e RoR $\gamma$ t) no grupo tratado com G-CSF (Fig. 3). Não foi verificada diferença significativa na expressão de STAT-1 entre os grupos tratado com G-CSF e o controle. Corroborando com as mudanças no perfil de expressão de fatores de transcrição, a expressão de citocinas pró-inflamatórias (IFN $\gamma$ , IL-17A, IL-17F e IL-6) foi reduzida no grupo tratado com G-CSF em relação ao

grupo controle. Ainda, o tratamento com G-CSF também levou a um aumento da aumento concomitante da expressão de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- $\beta$ , as quais são as principais citocinas produzidas por linfócitos T reguladores. Nós também detectamos um aumento na expressão de BDNF no grupo tratado com G-CSF comparado com o grupo controle.

Estudos recentes tem demonstrado que o receptor para G-CSF é expresso por neurônios no sistema nervoso central (SNC), e efeitos neuroprotetores do G-CSF tem sido observados [212]. Corroborando com essas observações, nós demonstramos que o tratamento *in vivo* com G-CSF aumenta a expressão de BDNF, o qual é um fator neurotrófico envolvido com a neuroproteção. Esse fator de crescimento é também secretado por linfócitos e outras células do sistema imunológico [215], provavelmente já fazendo parte do sistema de reparação dos danos causados pela inflamação. Desta forma, o G-CSF teria um papel não apenas na supressão da resposta autorreativa na EAN, mas também sobre os aspectos neurodegenerativos da doença.

### AÇÃO DIRETA DO G-CSF SOBRE CÉLULAS NEURITOGÊNICAS E/OU DCS MADURAS

Acredita-se que o G-CSF afete a resposta inflamatória por recrutar células dendríticas imaturas, as quais possuem um perfil tolerogênico e podem induzir caráter regulador nos linfócitos T *naive* [216].

Para investigar o efeito do G-CSF sobre células T já ativadas, as quais podem expressar receptores para G-CSF (G-CSFR) [217], e/ou sobre células apresentadoras de antígenos maduras, nós geramos clones neuritogênicos de células T de animais previamente imunizados, específicos para o peptídeo P2<sub>53-78</sub>. As células T neuritogênicas foram estimuladas com APCs providas do timo previamente irradiadas e com o peptídeo P2<sub>53-78</sub>, e foram cultivadas com e sem G-CSF. Nós observamos uma redução significativa na resposta proliferativa de células T neuritogênicas na presença de G-CSF, comparada com a resposta proliferativa de linfócitos T neuritogênicos cultivados na ausência de G-CSF (Fig. 4A). A fim de se verificar se a incubação com o G-CSF interfere também na ativação das células neuritogênicas, além da sua ação sobre a linfoproliferação, nós avaliamos a expressão de fatores de transcrição envolvidos na resposta próinflamatória Th1 e/ou Th17. Verificamos que o G-CSF reduziu significativamente a expressão de fatores de transcrição próinflamatórios T-bet e RoR- $\alpha$ , não apresentando diferença significativa na expressão de ROR $\gamma$ t, *in vitro* (Fig. 4B). Esses resultados sugerem que o G-CSF também pode agir nas APCs maduras e/ou em linfócitos T ativados.

A fim de confirmar a menor ativação das células neuritogênicas, nós transferimos quantidades iguais dessas células intravenosamente para ratos Lewis fêmeas normais. A transferência adotiva das células T autorreativas normalmente induz EAN em ratos Lewis *naive*. Nós observamos uma gravidade significativamente reduzida

nos animais que receberam linfócitos T neuritogênicos cultivados com G-CSF em relação aos animais que receberam as células controles, cultivadas sem G-CSF (Fig. 4C). A menor gravidade da doença, juntamente com os dados de proliferação e expressão de fatores de transcrição, indicam que o G-CSF apresenta um papel direto ou indireto sobre a ativação dos linfócitos T neuritogênicos.

# CONCLUSÃO

Os nossos resultados mostraram que o G-CSF é capaz de:

1. Reduzir a gravidade da EAN, com uma concomitante redução da quantidade de células mononucleares infiltradas na região endoneural dos nervos ciáticos dos animais tratados.
2. Reduzir a capacidade proliferativa das células T na presença do G-CSF *in vitro*.
3. Aumentar significativamente o percentual de células T reguladoras, tanto de T CD4<sup>+</sup> quanto de T CD8<sup>+</sup> nos linfonodos, combinado com uma redução da expressão de fatores de transcrição e citocinas pró-inflamatórias, e um aumento significativo na expressão de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- $\beta$ ) e de Foxp3.
4. Aumentar a expressão do fator neurotrófico BDNF.
5. Agir sobre linfócitos ativados e/ou células dendríticas já maduras, resultando na diminuição da proliferação *in vitro* e na diminuição da gravidade da doença.
6. Diminuir a expressão de mRNA para fatores de transcrição pró-inflamatórios (T-bet, RoR $\alpha$ ) *in vitro*, nas células T neuritogênicas cultivadas com G-CSF.
7. Portanto, nossos dados sugerem que o G-CSF atua estimulando simultaneamente citocinas anti-inflamatórias e fator neuroprotetor BDNF no modelo da neurite experimental autoimune.

# FIGURAS E LEGENDAS

FIGURA 1

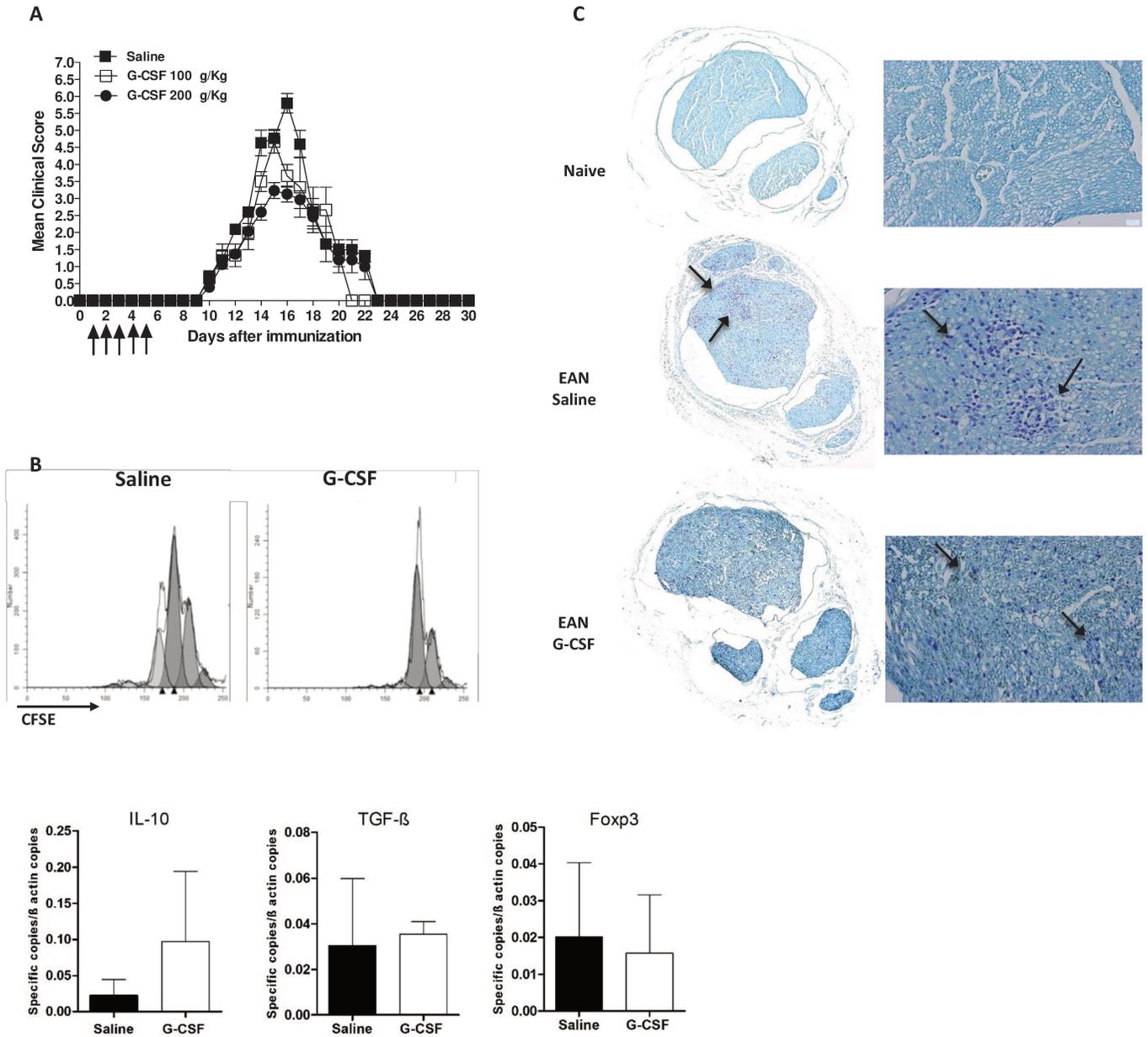


FIGURA 2

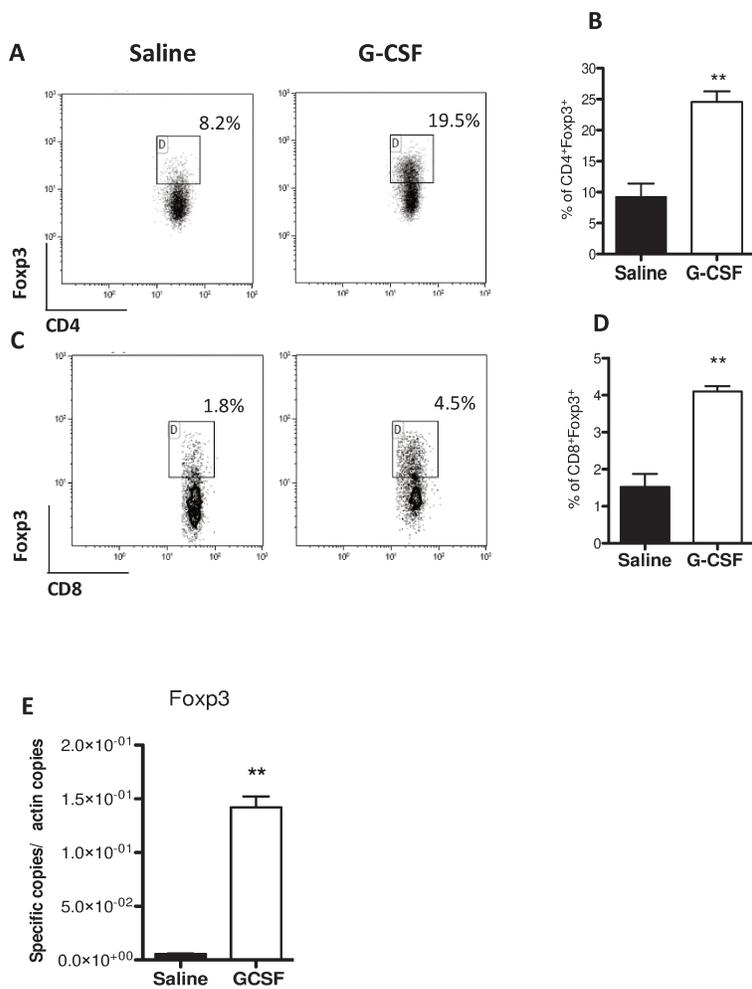


FIGURA 3

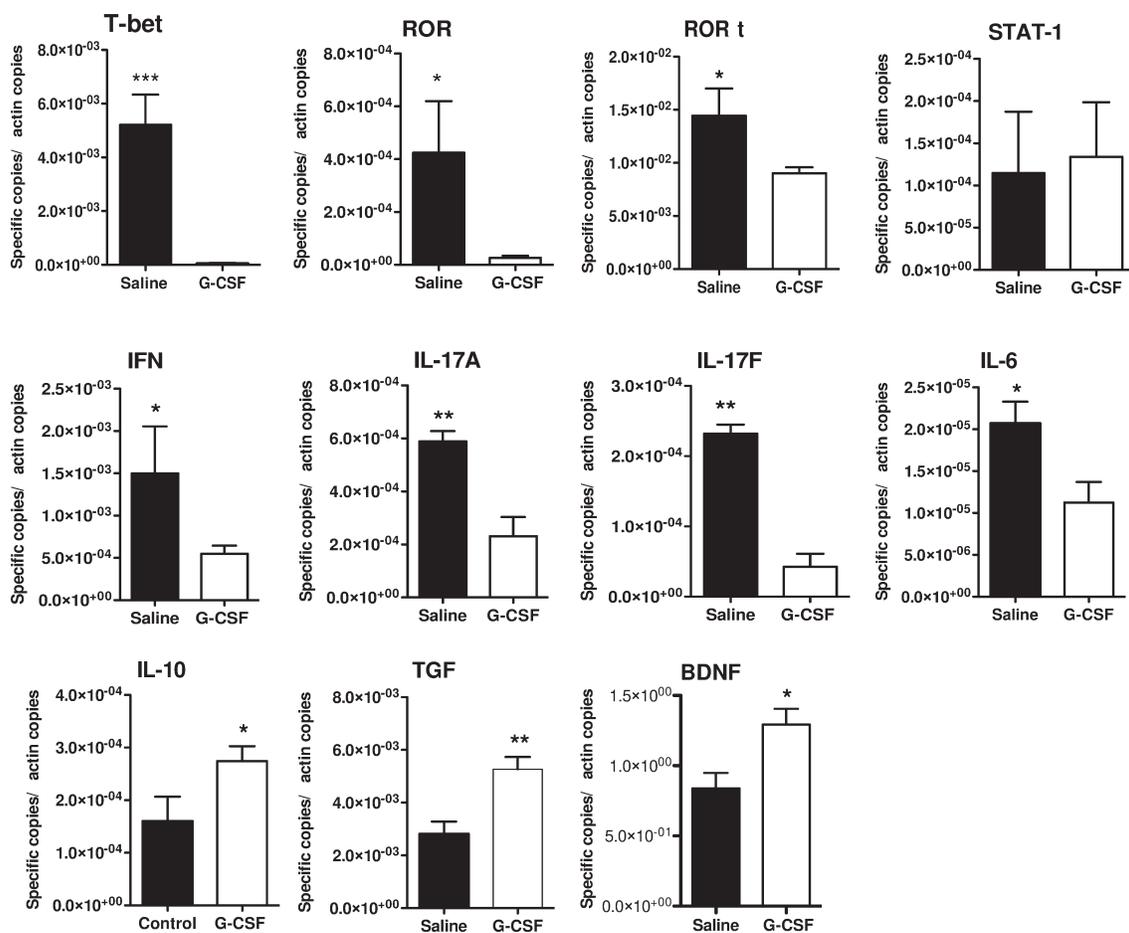
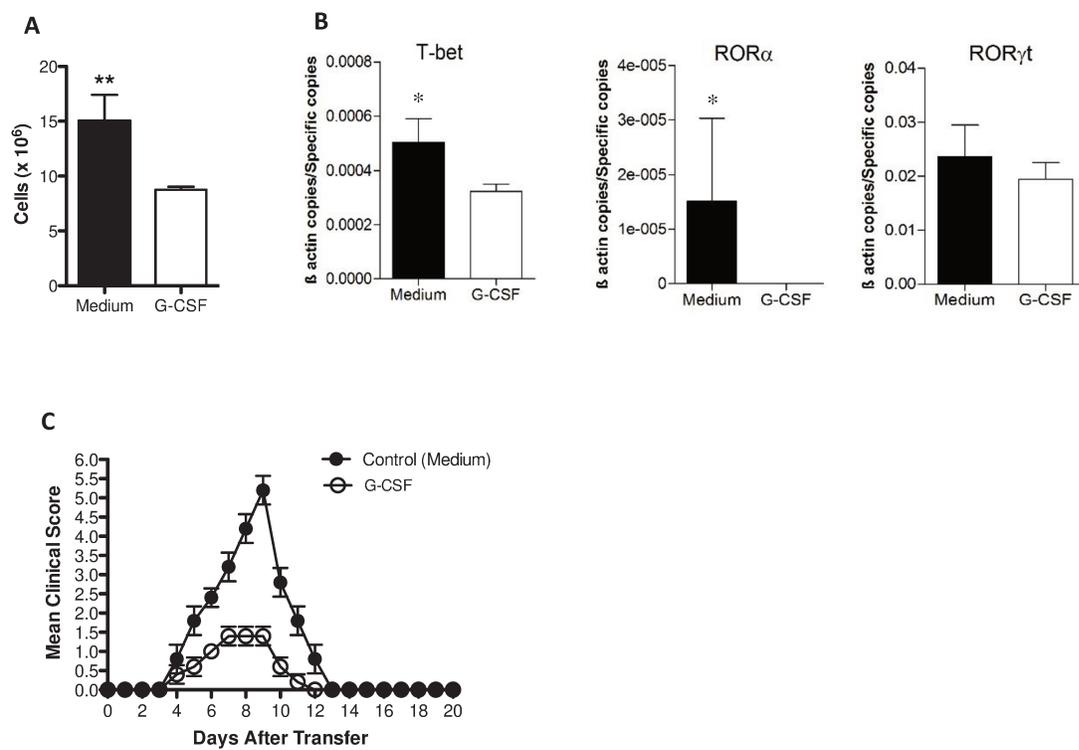


FIGURA 4



## FIGURA 1

- (A) Evolução clínica da EAN em ratos Lewis, os quais receberam intraperitonealmente doses de 200  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$  (círculo preto) e 100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$  (quadrados brancos) de G-CSF por 5 dias consecutivos, começando no dia 0 após a imunização. O Grupo controle (círculos pretos) recebeu o mesmo volume de salina estéril pelo mesmo período.
- (B) Resposta proliferativa de linfócitos T, marcados com CFSE, dos linfonodos de ratos Lewis com EAN tratados com salina ou com 200  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$  de G-CSF e estimulados com o peptídeo P<sub>253-78</sub> (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).
- (C) Cortes histológicos transversais de nervo ciático, retirados 15 dias após a imunização de ratos Lewis naive, e dos grupos tratados com a salina e com G-CSF. Os cortes foram corados com *Luxol Fast Blue* e contracorados com *Cresyl Violet* (setas indicam focos inflamatórios). As imagens foram feitas utilizando-se uma lente objetiva com aumento de 8x (coluna da esquerda) e 40x (coluna da direita).
- (D) Expressão gênica de Foxp3 e citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- $\beta$ ) em células do nervo ciático, retirados 12 dias após a imunização, de ratos Lewis tratados com salina (barras pretas) e com 200  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$  de G-CSF (barras brancas).

\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$  (Mann-Whitney test)

## Figura 2

(A – B) Quantificação de linfócitos T CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> de linfonodos, feita por citometria de fluxo (A são gráficos representativos do tipo *dot plot*, B é a média de 5 experimentos independentes).

(C – D) Quantificação de linfócitos T CD8<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> de linfonodos, feita por citometria de fluxo (C são gráficos representativos do tipo *dot plot*, D é a média de 5 experimentos independentes).

(E) Expressão de mRNA para Foxp3 nos linfonodos, retirados 10 dias após a imunização, de ratos tratados com salina (barras pretas) e com 200 µg/kg/dia de G-CSF (barras brancas).

\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$  (Mann-Whitney test)

## Figura 3

Expressão de fatores de transcrição e de citocinas pró-inflamatórias (T-bet, ROR $\alpha$ , ROR $\gamma$ t, STAT-1 e IFN $\gamma$ , IL-17A, IL-17F e IL-6, respectivamente), de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- $\beta$ ) e de BDNF nos linfonodos, retirados 10 dias após a imunização, de ratos Lewis tratados com salina (barras pretas) ou com 200 µg/kg/dia de G-CSF (barras brancas).

\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$  (Mann-Whitney test)

## Figura 4

(A, C) Resposta proliferativa de linfócitos T neuritogênicos. As células (na quantidade inicial de  $4 \times 10^6$ ) foram cultivadas apenas em meio de cultura (barras pretas) ou com meio suplementado com 10 ng/mL de G-CSF (barras brancas) e estimuladas com antígeno específico. Após 3 dias de cultura, as células foram marcadas com Azul de Trypan e contadas em uma contadora de células automática TC10 (BioRad, USA) (A). Após 3 dias de cultura, as células ( $5 \times 10^6$ ) foram adotivamente transferidas por via intravenosa a ratos Lewis *naive*. A evolução clínica foi feita diariamente (C).

(B) Expressão gênica *in vitro* de fatores de transcrição proinflamatórios (T-bet, RoR $\alpha$  e RoR $\gamma$ t) em células neuritogênicas cultivadas com timócitos irradiados, cultivados apenas com meio de cultura (barras pretas) ou com meio suplementado com 10 ng/mL de G-CSF (barras brancas).

\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$  (Mann-Whitney test)

# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Alshekhlee A, Hussain Z, Sultan B, Katirji B. Guillain-Barre syndrome: incidence and mortality rates in US hospitals. *Neurology* 2008, 70:1608-1613.
- (2) van Doorn PA. What's new in Guillain-Barré syndrome in 2007-2008? *J Peripher Nerv Syst* 2009, 14:72-74.
- (3) Guillain G, Barré JA, Strohl A. Le réflexe médico-plantaire: Étude de ses caracteres graphiques et de son temps perdu. *Bulletin et mémoires de la Société des Médecins des Hôpitaux de Paris*, 1916, 40: 1459-1462.
- (4) Guillain G, Barré JA, Strohl A. Sur un syndrome de radiculonévrite avec hyperalbuminose du liquide céphalo-rachidien sans réaction cellulaire. Remarques sur les caractères cliniques et graphiques des réflexes tendineux. *Bulletins et mémoires de la Société des Médecins des Hôpitaux de Paris*, 1916, 40: 1462-1470.
- (5) Draganesco H, Claudian H. Sur un cas de radiculonévrite curable (syndrome de Guillain-Barré) apparue au cours d'une ostéomyélite du bras. *Revue neurologique, Paris*, 1927, 2: 517-521.
- (6) Asbury A. New concepts of Guillain-Barré syndrome. *J Child Neurol.* 2000;15:183-191
- (7) Asbury AK, Cornblath DR. Assessment of current diagnostic criteria for Guillain-Barré syndrome. *Ann Neurol.* 1990;27:S21-S24

- (8) Winer JB, Hughes RA, Anderson MJ. A prospective study of acute idiopathic neuropathy. II. Antecedent events. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1988;51:613–18.
- (9) Royden-Jones H. Childhood Guillain-Barré syndrome: clinical presentation, diagnosis, and therapy. *J Child Neurol*. 1996;11:4 –12
- (10) van Koningsveld R, Van Doorn PA, Schmitz PI, Ang CW, Van der Meché FG. Mild forms of Guillain-Barré syndrome in an epidemiologic survey in The Netherlands. *Neurology*. 2000 Feb 8;54(3):620-5.
- (11) Rees JH, Gregson NA, Hughes RA. Anti-ganglioside GM1 antibodies in Guillain-Barré syndrome and their relationship to *Campylobacter jejuni* infection. *Ann Neurol*, 1995;38:809–16.
- (12) Dowling PC, Cook SD. Role of infection in Guillain-Barré syndrome: laboratory confirmation of herpesviruses in 41 cases. *Ann Neurol* 1981;9 (suppl):44–55.
- (13) Tam CC, O'Brien SJ, Petersen I, Islam A, Hayward A, Rodrigues LC. Guillain-Barré syndrome and preceding infection with *Campylobacter*, influenza and Epstein-Barr virus in the general practice research database. *PLoS One* 2007; 2(4):e344.
- (14) Gaydos JC, Top FH, Hodder RA, Russell PK. Swine influenza: A outbreak, Fort Dix, New Jersey, 1976. *Emerg Infect Dis* 2006; 12(1):23–28.

- (15) Safranek TJ, Lawrence DN, Kurland LT. Reassessment of the association between Guillain-Barré syndrome and receipt of swine influenza vaccine in 1976–1977: results of a two-state study. Expert Neurology Group. *Am J Epidemiol* 1991; 133(9):940–951.
- (16) Finberg, HV. Swine flu of 1976: lessons from the past. *Bull World Health Organ* 2009; 87:414–415.
- (17) Schonberger LB, Bregman DJ, Sullivan-Bolyai JZ, Keenlyside RA, Ziegler DW, Retalliau HF, Eddins DL, Bryan JA. Guillain-Barré syndrome following vaccination in the National Influenza Immunization Program, United States, 1976–1977. *Am J Epidemiol* 1979; 110(2):105–123.
- (18) Hughes RA, Rees JH. Clinical and epidemiological features of Guillain-Barré syndrome. *J Infect Dis* 1997; 176(Suppl 2):S92–S98.
- (19) Schonberger LB, Bregman DJ, Sullivan-Bolyai JZ, Keenlyside RA, Ziegler DW, Retalliau HF, Eddins DL, Bryan JA. Guillain-Barré syndrome following vaccination in the National Influenza Immunization Program, United States, 1976--1977. *Am J Epidemiol* 1979, 110:105-123.
- (20) Souayah N, Nasar A, Suri MF, Qureshi AI. Guillain-Barré syndrome after vaccination in United States a report from the CDC/FDA Vaccine Adverse Event Reporting System. *Vaccine* 2007, 25:5253-5255.

- (21) Alter M. The epidemiology of Guillain-Barré syndrome. *Ann Neurol* 1990;27(suppl):S7–12.
- (22) Kaplan JE, Katona P, Hurwitz ES, Schonberger LB. Guillain-Barré syndrome in the United States, 1979–1980 and 1980–1981. Lack of an association with influenza vaccination. *JAMA* 1982;248:698–700.
- (23) Prineas JW. Pathology of the Guillain-Barré syndrome. *Ann Neurol* 1981, 9 Suppl:6-19.
- (24) Winer JB. Guillain Barré syndrome. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 2001;54:381–385
- (25) The Italian Guillain-Barré Study Group. The prognosis and main prognostic indicators of Guillain-Barré syndrome: a multicentre prospective study of 297 patients. *Brain* 1996;119(Pt 6):2053–2061.
- (26) Fletcher DD, Lawn ND, Wolter TD, Wijdicks EF. Long-term outcome in patients with Guillain-Barré syndrome requiring mechanical ventilation. *Neurology* 2000;54(12):2311–2315.
- (27) Lawn ND, Wijdicks EF. Tracheostomy in Guillain-Barré syndrome. *Muscle & Nerve* 1999;22(8):1058–1062.
- (28) Ropper AH. Severe acute Guillain-Barreé syndrome. *Neurology* 1986; 36(3):429–432.

- (29) Winer JB, Hughes RA, Greenwood RJ, Perkin GD, Healy MJ. Prognosis in Guillain-Barré syndrome. *Lancet* 1985;1(8439):1202–1203.
- (30) Cheng BC, Chang WN, Chang CS, Tsai NW, Chang CJ, Hung PL, Wang KW, Chen JB, Tsai CY, Hsu KT, Chang HW, Lu CH. Predictive factors and long-term outcome of respiratory failure after Guillain-Barré syndrome. *Am J Med Sci* 2004;327(6):336–340.
- (31) Aggarwal AN, Gupta D, Lal V, Behera D, Jindal SK, Prabhakar S. Ventilatory management of respiratory failure in patients with severe Guillain-Barré syndrome. *Neurol India* 2003;51(2):203–205.
- (32) Waksman BH, Adams RD. Allergic neuritis: an experimental disease of rabbits induced by the injection of peripheral nervous tissue and adjuvants. *J Exp Med.* 1955 Aug 1;102(2):213-36.
- (33) Brostoff SW, Sacks H and Dipaol D. The p2 protein of bovine root myelin: partial chemical characterization. *Journal of Neurochemistry*, 1975, Vol. 24, pp. 28Y-294.
- (34) Hahn AF, Feasby TE, Wilkie L, Lovgren D. *Acta neuropathol.* 1991;82(1):60-5. P2-peptide induced experimental allergic neuritis: a model to study axonal degeneration.

- (35) Milner P, Lovelidge CA, Taylor WA, Hughes RAC. P0 myelin protein produces experimental allergic neuritis in Lewis rats. *Journal of the Neurological Sciences*, 1987, 79:275-285 275.
- (36) Waksman BH, Adams RD. A comparative study of experimental allergic neuritis in the rabbit, guinea pig and mouse. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1956 Jul;15(3):293-334.
- (37) Hoffman PM, Powers JM, Weise MJ, Brostoff SW. Experimental allergic neuritis. I. Rat strain differences in the response to bovine myelin antigens. *Brain Res*. 1980 Aug 18;195(2):355-62.
- (38) Gold R, Hartung HP, Toyka KV. Animal models for autoimmune demyelinating disorders of the nervous system. *Mol Med Today*. 2000 Feb;6(2):88-91.
- (39) Lampert P. Mechanism of demyelination in experimental allergic neuritis: Electron microscopic studies. *Lab Invest* 1969;20:127-38.
- (40) Byron H. Waksman, Raymond D. Adams. Allergic neuritis: an experimental disease of rabbits induced by the injection of peripheral nervous tissue and adjuvants. *J exp med*. 1955 august 1; 102(2): 213-236.
- (41) Mäurer M, Toyka KV, Gold R. Cellular immunity in inflammatory autoimmune neuropathies. *Rev Neurol (Paris)*. 2002 Dec;158(123):7-15.

- (42) Steinman L, Smith ME, Forno LS. Genetic control of susceptibility to experimental allergic neuritis and the immune response to P2 protein. *Neurology* 1981;31:950-954.
- (43) Hughes RAC, Kadlubowski CM, Gray IA, Leibowitz S. Immune responses in experimental allergic neuritis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1981;44: 565-569.
- (44) Milek DJ, Cunningham JM, Powers JM, Brostoff SW. Experimental allergic neuritis: humoral and cellular immune responses to the cyanogen bromide peptides of the P2 protein. *J Neuroimmunol* 1983;4:105-117
- (45) Nomura K, Hamaguchi K, Ohno R. Cell-mediated immunity to bovine Pz protein and neuritogenic synthetic peptide in experimental allergic neuritis. *J Neuroimmunol* 1987;15:25- 35.
- (46) Linington C, Izumo S, Suzuki M, Uyemura K, Meyermann R, Wekerle H. A permanent rat T cell line that mediates experimental allergic neuritis in the Lewis rat in vivo. *J Immunol* 1984;133:1946-1950.
- (47) Rostami A, Burns JB, Brown MJ, Rosen J, Zweiman B, Lisak RP, Pleasure DE. Transfer of experimental allergic neuritis with P2-reactive T-cell lines. *Cell Immunol* 1985;91:354-361.

- (48) Brosnan JV, Craggs RI, King RHM, Thomas PK. Reduced susceptibility of T cell-deficient rats to induction of experimental allergic neuritis. *J Neuroimmunol* 1987;14:267-282.
- (49) Hartung HP, Schifer B, Diamantstein T. Suppression of P2-T cell line-mediated experimental autoimmune neuritis by interleukin-2 receptor targeted monoclonal antibody ART18. *Brain Res* 1989;489:120-128
- (50) Kieseier BC, Kiefer R, Gold R, Hemmer B, Willison HJ, Hartung HP: Advances in understanding and treatment of immune-mediated disorders of the peripheral nervous system. *Muscle Nerve* 2004, 30:131-156.
- (51) Archelos JJ, Previtali SC, Hartung HP. The role of integrins in immune-mediated diseases of the nervous system. *Trends Neurosci* 1999;22:30 –38.
- (52) Kieseier BC, Krivacic K, Jung S, Pischel H, Toyka KV, Ransohoff RM, Hartung HP. Sequential expression of chemokines in experimental autoimmune neuritis. *J Neuroimmunol* 2000;110:121–129.
- (53) Kieseier BC, Kiefer R, Gold R, Hemmer B, Hugh J, Willison, Hartung HP. Advances in understanding and treatment of immune-mediated disorders of the peripheral nervous system.

- (54) Hartung HP, Schäfer B, van der Meide PH, Fierz W, Heininger K, Toyka KV. The role of interferon- $\gamma$  in the pathogenesis of experimental autoimmune disease of the peripheral nervous system. *Ann Neurol* 1990; 27:247-257.
- (55) Kiefer R, Kieseier BC, Brück W, Toyka KV, Hartung HP. Macrophage differentiation antigens in acute and chronic autoimmune polyneuropathies. *Brain* 1998;121:469 – 479.
- (56) Kiefer R, Kieseier BC, Stoll G, Hartung HP. The role of macrophages in immune-mediated damage to the peripheral nervous system. *Progr Neurobiol* 2001;64:109 –127.
- (57) Farias AS, de la Hoz C, Castro FR, Oliveira EC, Ribeiro dos Reis JR, Silva JS, Langone F, Santos LM. Nitric oxide and TNF $\alpha$  effects in experimental autoimmune encephalomyelitis demyelination. *Neuroimmunomodulation*. 2007;14(1):32-8. Epub 2007 Aug 15.
- (58) Weishaupt A, Brück W, Hartung T, Toyka KV, Gold R. Schwann cell apoptosis in experimental autoimmune neuritis of the Lewis rat and the functional role of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Neurosci Lett* 2001;306:77– 80.
- (59) Hong-Liang Zhang A, Sheikh Azimullah B, Xiang-Yu Zheng A, Xiao-Ke Wang AC, Naheed Amir B, Eric P. Mensah-Brown D, Mariam Al Shamsi E, Allen Shahin E, Rayomand Press F , Jie Zhu AG, Abdu Adem. IFN- $\gamma$  deficiency

- exacerbates experimental autoimmune neuritis in mice despite a mitigated systemic Th1 immune response. *J Neuroimmunol.*, 2012; 246(1-2):18-26
- (60) Willenborg DO, Fordham S, Bernard CC, Cowden WB, Ramshaw IA. IFN-gamma plays a critical down-regulatory role in the induction and effector phase of myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 1996 Oct 15;157(8):3223-7.
- (61) Dowling PC, Cook SD. Role of infection in Guillain-Barré syndrome: laboratory confirmation of herpesviruses in 41 cases. *Ann Neurol* 1981;9 (suppl):44–55.
- (62) Zhang Z, Zhang ZY, Schluesener HJ: Compound A, a plant origin ligand of glucocorticoid receptors, increases regulatory T cells and M2 macrophages to attenuate experimental autoimmune neuritis with reduced side effects. *J Immunol* 2009, 183:3081-3091.
- (63) Martinez AN, Mehra S, Kaushal D. Role of Interleukin-6 (Il6) in innate immunity to Mycobacterium tuberculosis infection. *J Infect Dis.*, 2013 Jan 28.
- (64) Solt LA, Kumar N, Nuhant P, Wang Y, Lauer JL, Liu J, Istrate MA, Kamenecka TM, Roush WR, Vidović D, Schürer SC, Xu J, Wagoner G, Drew PD, Griffin PR, Burris TP. Suppression of TH17 differentiation and autoimmunity by a synthetic ROR ligand. *Nature.* 2011 Apr 28;472(7344):491-4.

- (65) Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, Geiser A, Lyght M, Flanders KC, Roberts AB, SpornMB, WardJM, KarlssonS. Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1993 Jan 15;90(2):770-4.
- (66) Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK: Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* 2008, 453:1051-1057.
- (67) Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK: Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006, 441:235-238.
- (68) Ghoreschi K, Laurence A, Yang XP, Tato CM, McGeachy MJ, Konkel JE, Ramos HL, Wei L, Davidson TS, Bouladoux N, Grainger JR, Chen Q, Kanno Y, Watford WT, Sun HW, Eberl G, Shevach EM, Belkaid Y, Cua DJ, Chen W, O'Shea JJ. Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF- $\beta$  signalling. *Nature*. 2010 Oct 21;467(7318):967-71.
- (69) Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGF $\beta$  in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*, 2006; 24,179–189.
- (70) Korn T, Oukka M, Kuchroo V, Bettelli E: Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. *Semin Immunol* 2007, 19:362-371.

- (71) Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y: The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity* 2008, 28:454-467.
- (72) Awasthi A, Carrier Y, Peron JP, Bettelli E, Kamanaka M, Flavell RA, Kuchroo VK, Oukka M, Weiner HL: A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells. *Nat Immunol* 2007, 8:1380-1389.
- (73) Zhang Z, Zhang ZY, Fauser U, Schliesener HJ. Distribution of Foxp3(+) T-regulatory cells in experimental autoimmune neuritis rats. *Exp Neurol*. 2009;216(1):75-82.
- (74) Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune T responses. *Annu. Rev. Immunol.*, 2004; 22, 531–562.
- (75) Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of selftolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.*, 1995; 155, 1151–1164.
- (76) Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S. Adv Control of autoimmunity by naturally arising regulatory CD4+ T cells. *Immunol*. 2003;81:331-71.
- (77) Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299, 1057–1061.

- (78) Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.*, 2003; 4, 330–336.
- (79) Khattri R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat. Immunol.*, 2003; 4, 337–342.
- (80) Horiuchi S, Ishiguro A, Nakagawa T, Shoji K, Nagai A, Arai K, Horikawa R, Kawai T, Watanabe N, Onodera M. A girl of IPEX syndrome with low expression of Foxp3. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi.* 2012;35(6):526-32.
- (81) Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 2001;27:20e1.
- (82) Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepers B, Clark LB, Yasayko SA, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF, Ramsdell F. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 2001;27:68e73
- (83) Chatila TA, Blaeser F, Ho N, Lederman HM, Voulgaropoulos C, Helms C, Bowcock AM. JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *The Journal of clinical investigation* 2000;106:R75e81.

- (84) Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003;299:1057e61.
- (85) Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, Faravelli F, Casanova JL, Buist N. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet* 2001;27:18e20.
- (86) William LM, Rudensky AY. Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nat. Immunol.*, 2007; 8, 277–284.
- (87) Allan SE, Crome SQ, Crellin NK, Passerini L, Steiner TS, Bacchetta R, Roncarolo MG, Levings MK. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int. Immunol.*, 2007; 19, 345–354.
- (88) Gavin MA, Torgerson TR, Houston E, DeRoos P, Ho WY, StrayPedersen, A, Ocheltree EL, Greenberg PD, Ochs HD, Rudensky AY. Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA*, 2006; 103, 6659–6664.
- (89) Farias AS, Talaisys RL, Blanco YC, Lopes SC, Longhini AL, Pradella F, Santos LM, Costa FT. Regulatory T cell induction during *Plasmodium chabaudi*

- infection modifies the clinical course of experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS ONE*. 2011;6(3):e17849.
- (90) Gavin M, Rudensky A. Control of immune homeostasis by naturally arising regulatory CD4+ T cells. *Curr. Opin. Immunol.*, 2003; 15, 690–696.
- (91) Floess S, Freyer J, Siewert C, Baron U, Olek S, Polansky J, Schlawe K, Chang HD, Bopp T, Schmitt E. Epigenetic control of the *foxp3* locus in regulatory T cells. *PLoS Biol.*, 2007; 5, e38.
- (92) Komatsu N, Mariotti-Ferrandiz ME, Wang Y, Malissen B, Waldmann H, Hori S. Heterogeneity of natural *Foxp3*+ T cells: a committed regulatory T-cell lineage and an uncommitted minor population retaining plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009; 106, 1903–1908.
- (93) Awasthi A, Carrier Y, Peron JP. A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10- producing anti-inflammatory T cells. *Nat Immunol* 2007;8:1380–1389.
- (94) Carrier Y, Yuan J, Kuchroo VK, Weiner HL. Th3 cells in peripheral tolerance. II. TGF-beta-transgenic Th3 cells rescue IL-2-deficient mice from autoimmunity. *J Immunol* 2007;178:172–178.
- (95) Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R. *Foxp3* + CD25 + CD4 + natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev* 2006;212:8–27.

- (96) Polansky JK, Kretschmer K, Freyer J, Floess S, Garbe A, Baron U, Olek S, Hamann A, von Boehmer H, Huehn J. DNA methylation controls Foxp3 gene expression. *Eur. J. Immunol.*, 2008; 38, 1654–1663.
- (97) Zheng Y, Josefowicz S, Chaudhry A, Peng XP, Forbush K, Rudensky AY. Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate. *Nature*, 2010; 463, 808–812.
- (98) Hsieh CS, Zheng Y, Liang Y, Fontenot JD, Rudensky AY. An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires. *Nat Immunol*, 2006; 7: 401–410.
- (99) Pacholczyk R, Ignatowicz H, Kraj P, Ignatowicz L. Origin and T cell receptor diversity of Foxp3+CD4+CD25+ T cells, 2006; *Immunity* 25: 249–259.
- (100) Klein L, Jovanovic K. Regulatory T cell lineage commitment in the thymus. *Semin. Immunol.*, 2011; 23, 401–409.
- (101) Lio CW, Hsieh CS. Becoming self-aware: the thymic education of regulatory T cells. *Curr. Opin. Immunol.*, 2011; 23, 213–219.
- (102) Cobbold SP, Castejon R, Adams E, Zelenika D, Graca L, Humm S, Waldmann H. Induction of foxP3+ regulatory T cells in the periphery of T cell receptor transgenic mice tolerized to transplants. *J. Immunol.*, 2004; 172, 6003–6010.

- (103) Lafaille MAC, Kutchukhidze N, Shen S, Ding Y, Yee H, Lafaille, JJ. Adaptive Foxp3+ regulatory T cell-dependent and independent control of allergic inflammation. *Immunity*, 2008; 29, 114–126.
- (104) Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J. Exp. Med.*, 2003; 198, 1875–1886
- (105) Du, J., Huang, C., Zhou, B. & Ziegler, S. F. Isoform-specific inhibition of RORamediated transcriptional activation by human Foxp3. *J. Immunol*, 2008. 180,4785–4792
- (106) Hawrylowicz, C. M. & O'Garra, A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nature Rev. Immunol.*, 2005; 5, 271–283.
- (107) Joetham A, Takeda K, Taube C, Miyahara N, Matsubara S, Koya T, Rha YH, Dakhama A, Gelfand EW. Naturally occurring lung CD4+CD25+ T cell regulation of airway allergic responses depends on IL-10 induction of TGF-β. *J. Immunol.*, 2007; 178, 1433–1442.
- (108) Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, Yamazaki S, Sakihama T, Itoh M, Kuniyasu Y, Nomura T, Toda M, Takahashi T. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in

- controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev.* 2001 Aug;182:18-32.
- (109) Lieberman, J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nature Rev. Immunol.*, 2003; 3, 361–370.
- (110) Herman AE, Freeman GJ, Mathis D, Benoist C. CD4+CD25+ T regulatory cells dependent on ICOS promote regulation of effector cells in the prediabetic lesion. *J. Exp. Med.*,2004; 199, 1479–1489.
- (111) McHugh RS. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity*, 2002; 16, 311–323
- (112) Gondek, DC, Lu LF, Quezada SA, Sakaguchi S, Noelle RJ. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J. Immunol*, 2005;. 174, 1783–1786.
- (113) Zhao, D. M., Thornton, A. M., DiPaolo, R. J. & Shevach, E. M. Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood*, 2006; 107, 3925–3932.
- (114) Ren X, Ye F, Jiang Z, Chu Y, Xiong S, Wang Y. Involvement of cellular death in TRAIL/ DR5-dependent suppression induced by CD4+CD25+ regulatory T cells. *Cell Death. Differ*, 2007; 14, 2076–2084.

- (115) Garín MI, Chu CC, Golshayan D, Cernuda-Morollón E, Wait R, Lechler RI. Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood*, 2007 109, 2058–2065.
- (116) Zettl UK, Gold R, Hartung HP, Toyka KV. Apoptotic cell death of T-lymphocytes in experimental autoimmune neuritis of the Lewis rat. *Neurosci Lett*. 1994 Jul 18;176(1):75-9.
- (117) Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J. Exp. Med.*, 1998; 188, 287–296.
- (118) de la Rosa M, Rutz S, Dorninger H, Scheffold A. Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur. J. Immunol.*, 2004; 34, 2480–2488.
- (119) Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen JF, Enjoji K, Linden J, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB, Robson SC. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med.*, 2007 Jun 11;204(6):1257-65.
- (120) Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, Höpner S, Centonze D, Bernardi G, Dell'Acqua ML, Rossini PM, Battistini L, Röttschke O, Falk K. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*, 2007 Aug 15;110(4):1225-32.

- (121) Kobie JJ, Shah PR, Yang L, Rebhahn JA, Fowell DJ, Mosmann TR. T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine. *J Immunol.* 2006 Nov 15;177(10):6780-6.
- (122) Zarek PE, Huang CT, Lutz ER, Kowalski J, Horton MR, Linden J, Drake CG, Powell JD. A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood.* 2008 Jan 1;111(1):251-9.
- (123) Ernst PB, Garrison JC, Thompson LF. Much Ado about Adenosine: Adenosine Synthesis and Function in Regulatory T Cell Biology *J Immunol.* 2010 August 15; 185(4): 1993–1998.
- (124) Bopp T, Becker C, Klein M, Klein-Hessling S, Palmetshofer A, Serfling E, Heib V, Becker M, Kubach J, Schmitt S, Stoll S, Schild H, Staeger MS, Stassen M, Jonuleit H, Schmitt E. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med.* 2007 Jun 11;204(6):1303-10.
- (125) Bluestone JA, Tang Q. How do CD4+CD25+ regulatory T cells control autoimmunity? *Curr. Opin. Immunol.*, 2005; 17, 638–642.
- (126) Rutella S, Lemoli RM. Regulatory T cells and tolerogenic dendritic cells: from basic biology to clinical applications. *Immunol Lett.* 2004 Jun 15;94(1-2):11-26.

- (127) Blanco AP, Palucka K, Pascual V, Banchereau V. Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2008 February; 19(1): 41–52.
- (128) Tang Q, Adams JY, Tooley AJ, Bi M, Fife BT, Serra P, Santamaria P, Locksley RM, Krummel MF, Bluestone JA. Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice. *Nat Immunol.* 2006 Jan;7(1):83-92.
- (129) Tadokoro CE, Shakhar G, Shen S, Ding Y, Lino AC, Maraver A, Lafaille JJ, Dustin ML. Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo. *J Exp Med.* 2006 Mar 20;203(3):505-11.
- (130) Serra P, Amrani A, Yamanouchi J, Han B, Thiessen S, Utsugi T, Verdaguer J, Santamaria P. CD40 ligation releases immature dendritic cells from the control of regulatory CD4+CD25+ T cells. *Immunity.* 2003 Dec;19(6):877-89.
- (131) Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Vacca C, Bianchi R, Belladonna ML, Fioretti MC, Alegre ML, Puccetti P. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003 Dec;4(12):1206-12.
- (132) Mellor AL, Munn DH. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol.* 2004 Oct;4(10):762-74.

- (133) Cederbom L, Hall H, Ivars F. CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur. J. Immunol.*, 2000; 30, 1538–1543.
- (134) Taams LS, van Amelsfort JM, Tiemessen MM, Jacobs KM, de Jong EC, Akbar AN, Bijlsma JW, Lafeber FP. Modulation of monocyte/macrophage function by human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Hum Immunol.* 2005 Mar;66(3):222-30.
- (135) Tiemessen MM, Jagger AL, Evans HG, van Herwijnen MJ, John S, Taams LS. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2007; Dec 4;104(49):19446-51.
- (136) Chang CC, Ciubotariu R, Manavalan JS, Yuan J, Colovai AI, Piazza F, Lederman S, Colonna M, Cortesini R, Dalla-Favera R, Suciú-Foca N. Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nat Immunol.* 2002 Mar;3(3):237-43.
- (137) Endharti AT, Rifa'i M, Shi Z, Fukuoka Y, Nakahara Y, Kawamoto Y, Takeda K, Isobe K, Suzuki H. Cutting edge: CD8+CD122+ regulatory T cells produce IL-10 to suppress IFN-gamma production and proliferation of CD8+ T cells. *J Immunol.* 2005 Dec 1;175(11):7093-7.
- (138) Cosmi L, Liotta F, Lazzeri E, Francalanci M, Angeli R, Mazzinghi B, Santarlasci V, Manetti R, Vanini V, Romagnani P, Maggi E, Romagnani S,

- Annunziato F. Human CD8+CD25+ thymocytes share phenotypic and functional features with CD4+CD25+ regulatory thymocytes. *Blood*. 2003 Dec 1;102(12):4107-14.
- (139) Farias AS, Spagnol GS, Bourdeaux-Rego P, Oliveira COF, Fontana AG, De Paula RF, Santos MPA, Pradella F, Moraes AS, Oliveira EC, Longhini AL, Rezende ACS, Vaisberg M. Vitamin D3 induces IDO+ Tolerogenic DCs and Enhances Treg, Reducing the Severity of EAE. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 2013. (aceito para publicação).
- (140) Whetton, AD, Dexter TM. Myeloid haemopoietic growth factors. *Biochim. Biophys. Acta* 1989. 989, 111–132
- (141) Metcalf D, Nicola NA. *The Hemopoietic ColonyStimulating Factors: from Biology to Clinical Applications* (University Press, Cambridge, 1995).
- (142) Dai XM, Zong XH., Sylvestre V, Stanley ER. Incomplete restoration of colony-stimulating factor 1 (CSF-1) function in CSF-1-deficient *Csf1op/Csf1op* mice by transgenic expression of cell surface CSF-1. *Blood*, 2004. 103, 1114–1123.
- (143) Ahn M, Moon C, Lee Y, Koh CS, Kohyama K, Tanuma N, Matsumoto Y, Kim HM, Kim SR, Shin T. Activation of extracellular signal-regulated kinases in the sciatic nerves of rats with experimental autoimmune neuritis. *Neurosci Lett* 2004;372:57-61.

- (144) Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, Hoeve MA, Kramer M, Vaisberg E, Kastelein R, Kolk A, de Waal-Malefyt R, Ottenhoff TH. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco) bacteria. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2004; 101, 4560–4565.
- (145) Fleetwood AJ, Lawrence T, Hamilton JA, Cook AD. GM-CSF and M-CSF (CSF-1)-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities — implications for CSF blockade in inflammation. *J. Immunol.*, 2007; 178, 5245–5252.
- (146) Falk LA, Vogel SN. Comparison of bone marrow progenitors responsive to granulocyte–macrophage colony stimulating factor and macrophage colony stimulating factor-1. *J. Leukocyte Biol.*, 1988; 43, 148–157.
- (147) Hamilton JA. Colony stimulating factors, cytokines and monocyte–macrophages — some controversies. *Immunol. Today*, 1993; 14, 18–24.
- (148) Stanley ER, Berg KL, Einstein DB, Lee PS, Pixley FJ, Wang Y, Yeung YG. Biology and action of colonystimulating factor-1. *Mol. Reprod. Dev*, 1997; 46, 4–10.
- (149) Fleetwood AJ, Cook AD, Hamilton JA. Functions of granulocyte–macrophage colonystimulating factor. *Crit. Rev. Immunol*, 2005; 25, 405–428.

- (150) Burgess AW, Metcalf D. The nature and action of granulocyte–macrophage colony stimulating factors. *Blood* 1980. 56, 947–958
- (151) Handman E, Burgess AW. Stimulation by granulocyte–macrophage colony-stimulating factor of *Leishmania tropica* killing by macrophages. *J. Immunol.* 1979. 122, 1134–1137.
- (152) Hamilton JA, Stanley ER, Burgess AW, Shadduck RK. Stimulation of macrophage plasminogen activator activity by colony-stimulating factors. *J. Cell. Physiol* 1980. 103, 435–445.
- (153) Brines M, Cerami A. Erythropoietin-mediated tissue protection: reducing collateral damage from the primary injury response. *J Intern Med* 2008;264:405-32.
- (154) Nairz M, Sonnweber T, Schroll A, Theurl I, Weiss G. The pleiotropic effects of erythropoietin in infection and inflammation. *Microbes Infect* 2012;14:238-46.
- (155) Sasaki R, Masuda S, Nagao M. Erythropoietin: multiple physiological functions and regulation of biosynthesis. *Biosci Biotechnol Biochem* 2000;64:1775-93
- (156) Patel NS, Nandra KK, Thiemermann C. Erythropoietin and its derivatives as therapies in critical care. *Crit Care* 2012;16:229.

- (157) Velly L, Pellegrini L, Guillet B, Bruder N, Pisano P. Erythropoietin 2nd cerebral protection after acute injuries: a doubleedged sword? *Pharmacol Ther* 2010;128:445-59.
- (158) van der Kooij MA, Groenendaal F, Kavelaars A, Heijnen CJ, van Bel F. Neuroprotective properties and mechanisms of erythropoietin in in vitro and in vivo experimental models for hypoxia/ischemia. *Brain Res Rev* 2008;59:22-33.
- (159) Matis GK, Birbilis TA. Erythropoietin in spinal cord injury. *Eur Spine J* 2009;18:314-23.
- (160) Yuan R, Maeda Y, Li W, Lu W, Cook S, Dowling P. Erythropoietin: a potent inducer of peripheral immuno/inflammatory modulation in autoimmune EAE. *PLoS One* 2008;3:e1924.
- (161) Savino C, Pedotti R, Baggi F, Ubiali F, Gallo B, Nava S, Bigini P, Barbera S, Fumagalli E, Mennini T, Vezzani A, Rizzi M, Coleman T, Cerami A, Brines M, Ghezzi P, Bianchi R. Delayed administration of erythropoietin and its non-erythropoietic derivatives ameliorates chronic murine autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 2006;172:27-37.
- (162) Zhang X, Li QY, Xiao BG. Anti-inflammatory effect of erythropoietin therapy on experimental autoimmune encephalomyelitis. *Int J Neurosci* 2012;122:255-62.

- (163) Mausberg AK, Meyer Zu Hörste G, Dehmel T, Stettner M, Lehmann HC, Sheikh KA, Kieseier BC. Erythropoietin ameliorates rat experimental autoimmune neuritis by inducing transforming growth factor-beta in macrophages. *PLoS One* 2011;6:e26280.
- (164) Ahn M, Moon C, Jeong C, Matsumoto Y, Koh CS, Shin T. Upregulation of erythropoietin in rat peripheral nervous system with experimental autoimmune neuritis. *Brain Res* 2010;1333:82-90.
- (165) El-Behi M, Ciric B, Dai H, Yan Y, Cullimore M, Safavi F, Zhang GX, Dittel BN, Rostami A. The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nat Immunol.* 2011 Jun;12(6):568-75.
- (166) Codarri L, Gyölvézi G, Tosevski V, Hesse L, Fontana A, Magnenat L, Suter T, Becher B . ROR $\gamma$ t drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation..*Nat Immunol.* 2011 Jun;12(6):560-7
- (167) Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med.* 2005; Jan 17;201(2):233-40.

- (168) Shortman K, Naik SH. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nature Rev. Immunol.*, 2007; 7, 19–30.
- (169) Hamilton JA. Rheumatoid arthritis: opposing actions of haemopoietic growth factors and slow-acting antirheumatic drugs. *Lancet*, 1993.342, 536–539.
- (170) Firestein GS, Zvaifler NJ. How important are T cells in chronic rheumatoid synovitis? *Arthritis Rheum.*, 1990; 33, 768–773.
- (171) Hamilton JA, Campbell IK, Wojta J, Cheung D. Plasminogen activators and their inhibitors in arthritic disease. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1992; 667, 87–100.
- (172) Firestein GS, Zvaifler NJ. How important are T cells in chronic rheumatoid synovitis? *Arthritis Rheum.*, 1990; 33, 768–773.
- (173) Hamilton JA, Campbell IK, Wojta J, Cheung D. Plasminogen activators and their inhibitors in arthritic disease. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1992; 667, 87–100.
- (174) Campbell IK, Rich MJ, Bischof RJ, Hamilton JA. The colony-stimulating factors and collagen-induced arthritis: exacerbation of disease by M-CSF and G-CSF and requirement for endogenous M-CSF. *J. Leukocyte Biol.*, 2000; 68, 144–150.
- (175) Campbell IK, Rich MJ, Bischof RJ, Dunn AR, Grail D, Hamilton JA. Protection from collagen-induced arthritis in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-deficient mice. *J. Immunol*, 1998; 161, 3639–3644.

- (176) Cook AD, Braine EL, Campbell IK, Rich MJ, Hamilton JA. Blockade of collagen-induced arthritis post-onset by antibody to granulocyte–macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF): requirement for GM-CSF in the effector phase of disease. *Arthritis Res.*, 2001; 3, 293–298.
- (177) Gaudreau S, Guindi C, Ménard M, Besin G, Dupuis G, Amrani A. Granulocyte–macrophage colonystimulating factor prevents diabetes development in NOD mice by inducing tolerogenic dendritic cells that sustain the suppressive function of CD4+CD25+regulatory T cells. *J. Immunol.*, 2007; 179, 3638–3647.
- (178) Demetri GD, Griffin JD. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood*, 1991; 78: 2791–2808.
- (179) Anderlini P, Przepiorka D, Champlin R, Korbling M. Biologic and clinical effects of granulocyte colony-stimulating factor in normal individuals. *Blood*, 1996; 88:2819 –2825.
- (180) Rutella S, Rumi C, Sica S, Leone G. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rHuG-CSF): effects on lymphocyte phenotype and function. *J. Interferon Cytokine Res.*, 1999; 19: 989 –994.
- (181) Morikawa, K., S. Morikawa, M. Nakamura, and T. Miyawaki. 2002. Characterization of granulocyte colony-stimulating factor receptor expressed on human lymphocytes. *Br. J. Haematol.* 118: 296 –304.

- (182) Sloan EM, Kim S, Maciejewski JP, Van Rhee F, Chaudhuri A, Barrett J, Young NS: Pharmacologic doses of granulocyte colony-stimulating factor affect cytokine production by lymphocytes in vitro and in vivo. *Blood* 2000, 95:2269-2274.
- (183) Franzke A, Piao W, Lauber J, Gatzlaff P, Konecke C, Hansen W, Schmitt-Thomsen A, Hertenstein B, Buer J, Ganser A: G-CSF as immune regulator in T cells expressing the G-CSF receptor: implications for transplantation and autoimmune diseases. *Blood* 2003, 102:734-739.
- (184) Boneberg EM, Hareng L, Gantner F, Wendel A, Hartung T. Human monocytes express functional receptors for granulocyte colony-stimulating factor that mediate suppression of monokines and interferon  $\gamma$ . *Blood*, 2000; 95: 270–276.
- (185) Boneberg EM, Hartung T. Granulocyte colony-stimulating factor attenuates LPS-stimulated IL-1 $\beta$  release via suppressed processing of proIL-1 $\beta$ , whereas TNF- $\alpha$  release is inhibited on the level of proTNF- $\alpha$  formation. *Eur. J. Immunol.*, 2002; 32: 1717–1725.
- (186) Pollmächer T, Korth C, Mullington J, Schreiber W, Sauer J, Vedder H, Galanos C, Holsboer F. Effects of granulocyte colony-stimulating factor on plasma cytokine and cytokine receptor levels and on the in vivo host response to endotoxin in healthy men. *Blood*. 1996 Feb 1;87(3):900-5.

- (187) Rutella S, Rumi C, Lucia MB, Sica S, Cauda R, Leone G. Serum of healthy donors receiving granulocyte colony-stimulating factor induces T cell unresponsiveness. *Exp. Hematol.*, 1998; 26: 1024 –1033.
- (188) Rutella S, Rumi C, Pierelli L, Morosetti R, Sica S, Bonanno G, Scambia G, Leone G. Granulocyte colony-stimulating factor perturbs lymphocyte mitochondrial function and inhibits cell cycle progression. *Exp. Hematol.*, 2000; 28: 612– 625.
- (189) Rutella S, Pierelli L, Rumi C, Bonanno G, Marone M, Sica S, Capoluongo E, Ameglio F, Scambia G, Leone G. T cell apoptosis induced by granulocyte colony-stimulating factor is associated with retinoblastoma protein phosphorylation and reduced expression of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Exp. Hematol.*, 2001; 29:401– 415.
- (190) Rutella S, Rumi C, Testa U, Sica S, Teofili L, Martucci R, Peschle C, Leone G. Inhibition of lymphocyte blastogenic response in healthy donors treated with recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF): possible role of lactoferrin and interleukin-1 receptor antagonist. *Bone Marrow Transplant.* 1997 Sep;20(5):355-64.
- (191) Rondelli D, Raspadori D, Anasetti C, Bandini G, Re F, Arpinati M, Stanzani M, Morelli A, Baccini C, Zaccaria A, Lemoli RM, Tura S. Alloantigen presenting

- capacity, T cell alloreactivity and NK function of G-CSF-mobilized peripheral blood cells. *Bone Marrow Transplant*. 1998 Oct;22(7):631-7.
- (192) Mielcarek M, Graf L, Johnson G, Torok-Storb B. Production of interleukin-10 y granulocyte colony-stimulating factor-mobilized blood products: a mechanism for monocyte-mediated suppression of T cell proliferation. *Blood*, 1998; 92: 215–222.
- (193) Singh RK, Varney ML, Buyukberber S, Ino K, Ageitos AG, Reed E, Tarantolo S, Talmadge JE. Fas-FasL-mediated CD4+ T-cell apoptosis following stem cell transplantation. *Cancer Res*. 1999 Jul 1;59(13):3107-11.
- (194) Rodriguez PC, Zea AH, DeSalvo J, Culotta KS, Zabaleta J, Quiceno DG, Ochoa JB, Ochoa AC. L-arginine consumption by macrophages modulates the expression of CD3 zeta chain in T lymphocytes. *J Immunol*. 2003 Aug 1;171(3):1232-9.
- (195) Rodriguez PC, Quiceno DG, Zabaleta J, Ortiz B, Zea AH, Piazuelo MB, Delgado A, Correa P, Brayer J, Sotomayor EM, Antonia S, Ochoa JB, Ochoa AC. Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses. *Cancer Res*. 2004 Aug 15;64(16):5839-49.
- (196) Zou L, Barnett B, Safah H, Larussa VF, Evdemon-Hogan M, Mottram P, Wei S, David O, Curiel TJ, Zou W. Bone marrow is a reservoir for CD4+CD25+

- regulatory T cells that traffic through CXCL12/CXCR4 signals. *Cancer Res.* 2004 Nov 15;64(22):8451-5.
- (197) Kusnierz-Glaz CR, Still BJ, Amano M, Zukor JD, Negrin RS, Blume KG, Strober S. Granulocyte colony-stimulating factor-induced comobilization of CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> T cells and hematopoietic progenitor cells (CD34<sup>+</sup>) in the blood of normal donors. *Blood.* 1997 Apr 1;89(7):2586-95.
- (198) Vuckovic S, Kim M, Khalil D, Turtle CJ, Crosbie GV, Williams N, Brown L, Williams K, Kelly C, Stravos P. Granulocyte-colony stimulating factor increases CD123<sup>hi</sup> blood dendritic cells with altered CD62L and CCR7 expression. *Blood,* 2003; 101: 2314–2317.
- (199) Rutella S, Pierelli L, Bonanno G, Sica S, Ameglio F, Capoluongo E, Mariotti A, Scambia G, d’Onofrio G, Leone G. Role for granulocyte colony-stimulating factor in the generation of human T regulatory type 1 cells. *Blood,* 2002; 100: 2562–2571.
- (200) Arpinati M, Green CL, Heimfeld S, Heuser JE, Anasetti C. Granulocyte-colony stimulating factor mobilizes T helper 2-inducing dendritic cells. *Blood,* 200; 95: 2484–2490.
- (201) Rutella S, Bonanno G, Pierelli L, Mariotti A, Capoluongo E, Contemi AM, Ameglio F, Curti A, De Ritis DG, Voso MT. Granulocyte colony-stimulating factor

- promotes the generation of regulatory DC through induction of IL-10 and IFN $\alpha$ .  
Eur.J. Immunol. . 2004, 34:1291-1302
- (202) Pulendran B, Banchereau J, Burkeholder S, Kraus E, Guinet E, Chalouni C, Caron D, Maliszewski C, Davoust J, Fay J, and K Palucka: Flt3-ligand and granulocyte-colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets in vivo. J. Immunol 2004. 165:566-572.
- (203) Zavala F, Masson A, Hadaya K, Ezine S, Schneider E, Babin O, Bach JF. Granulocyte-colony stimulating factor treatment of lupus autoimmune disease in MRL-lpr/lpr mice. J Immunol. 1999 Nov 1;163(9):5125-32.
- (204) Scapini P, Nardelli B, Nadali G, Calzetti F, Pizzolo G, Montecucco C, Cassatella MA. G-CSF-stimulated neutrophils are a prominent source of functional BLyS. J Exp Med. 2003 Feb 3;197(3):297-302.
- (205) Pascual V, Banchereau J, Palucka AK. The central role of dendritic cells and interferon-alpha in SLE. Curr Opin Rheumatol. 2003 Sep;15(5):548-56.
- (206) Mackay F, Woodcock SA, Lawton P, Ambrose C, Baetscher M, Schneider P, Tschopp J, Browning JL. Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations. J. Exp. Med., 1999; 190: 1697–1710.
- (207) Mathian A, Weinberg A, Gallegos M, Banchereau J, Koutouzov S. IFN-alpha induces early lethal lupus in preautoimmune (New Zealand Black x New

- Zealand White) F1 but not in BALB/c mice. *J Immunol.* 2005 Mar 1;174(5):2499-506.
- (208) Lawlor KE, Campbell IK, Metcalf D, O'Donnell K, van Nieuwenhuijze A, Roberts AW, Wicks IP. Critical role for granulocyte colony-stimulating factor in inflammatory arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 101: 11398–11403.
- (209) Brendolan A, Higuchi M, Sibley R, Strober S. Treatment of adjuvant arthritis with granulocyte-colony stimulating factor and peptide derived from heat shock protein 65. *Cell Immunol.* 2003 Jan;221(1):6-14.
- (210) Zavala F, Abad S, Ezine S, Taupin V, Masson A, Bach JF. G-CSF therapy of ongoing experimental allergic encephalomyelitis via chemokine- and cytokine-based immune deviation. *J Immunol.* 2002 Feb 15;168(4):2011-9.
- (211) Lock C, Hermans G, Pedotti R, Brendolan A, Schadt E, Garren H, Langer-Gould A, Strober S, Cannella B, Allard J, Klonowski P, Austin A, Lad N, Kaminski N, Galli SJ, Oksenberg JR, Raine CS, Heller R, Steinman L. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med.* 2002 May;8(5):500-8.
- (212) Schneider A, Krüger C, Steigleder T, Weber D, Pitzer C, Laage R, Aronowski J, Maurer MH, Gassler N, Mier W, Hasselblatt M, Kollmar R, Schwab S, Sommer C, Bach A, Kuhn HG, Schäbitz WR. The hematopoietic factor G-CSF is a

- neuronal ligand that counteracts programmed cell death and drives neurogenesis. *J Clin Invest*. 2005;115:2083–2098.
- (213) Stienekemeier M , Falk K, Röttschke O, Weishaupt A, Schneider C, Toyka KV, Gold R , and Strominger JL. Vaccination, prevention, and treatment of experimental autoimmune neuritis (EAN) by an oligomerized T cell epitope. *PNAS*. 2001;98(24):13872–13877
- (214) Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008;133(5):775-787.
- (215) Yoshimura S, Ochi H, Isobe N. Altered production of brain-derived neurotrophic factor by peripheral blood immune cells in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2010;16(10):1178-1188.
- (216) Hamilton JA. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(7):533-544.
- (217) Franzke A, Piao W, Lauber J, Gatzlaff P, Könecke C, Hansen W, Schmitt-Thomsen A, Hertenstein B, Buer J, Ganser A. G-CSF as immune regulator in T cells expressing the G-CSF receptor: implications for transplantation and autoimmune diseases. *Blood*. 2003;102(2):734-739.

# ANEXOS

## Granulocyte–Colony-Stimulating Factor Treatment Enhances Foxp3<sup>+</sup> T Lymphocytes and Modifies the Proinflammatory Response in Experimental Autoimmune Neuritis

Fernando Pradella,<sup>1,2</sup> Adriel S. Moraes,<sup>1,2</sup> Mariana P. A. Santos,<sup>1,2</sup> Rosemeire F. O. DePaula,<sup>1,2</sup> Karina Y. Degaki,<sup>3</sup> Ana Leda F. Longhini,<sup>1</sup> Vania D. R. Silva,<sup>1</sup> Leonilda M. B. Santos<sup>2</sup> & Alessandro S. Farias<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Neuroimmunomodulation Group, Department of Genetics, Evolution and Bioagents, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

<sup>2</sup> Neuroimmunology Unit, Department of Genetics, Evolution and Bioagents, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

<sup>3</sup> Department of Histology, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

### Correspondence

A. S. Farias, Ph.D. or L. M. B. Santos, Ph.D.,  
Departamento de Genética, Evolução e  
Bioagentes, Instituto de Biologia, UNICAMP,  
Campinas, SP CEP 13083-970, Brazil.

Tel.: +55-19-35216263;

Fax: +55-19-35216185;

E-mails: asfarias@unicamp.br (ASF) or

leonilda@unicamp.br (LMBS)

Received 27 February 2013; revision 13

March 2013; accepted 15 March 2013.

doi: 10.1111/cns.12112

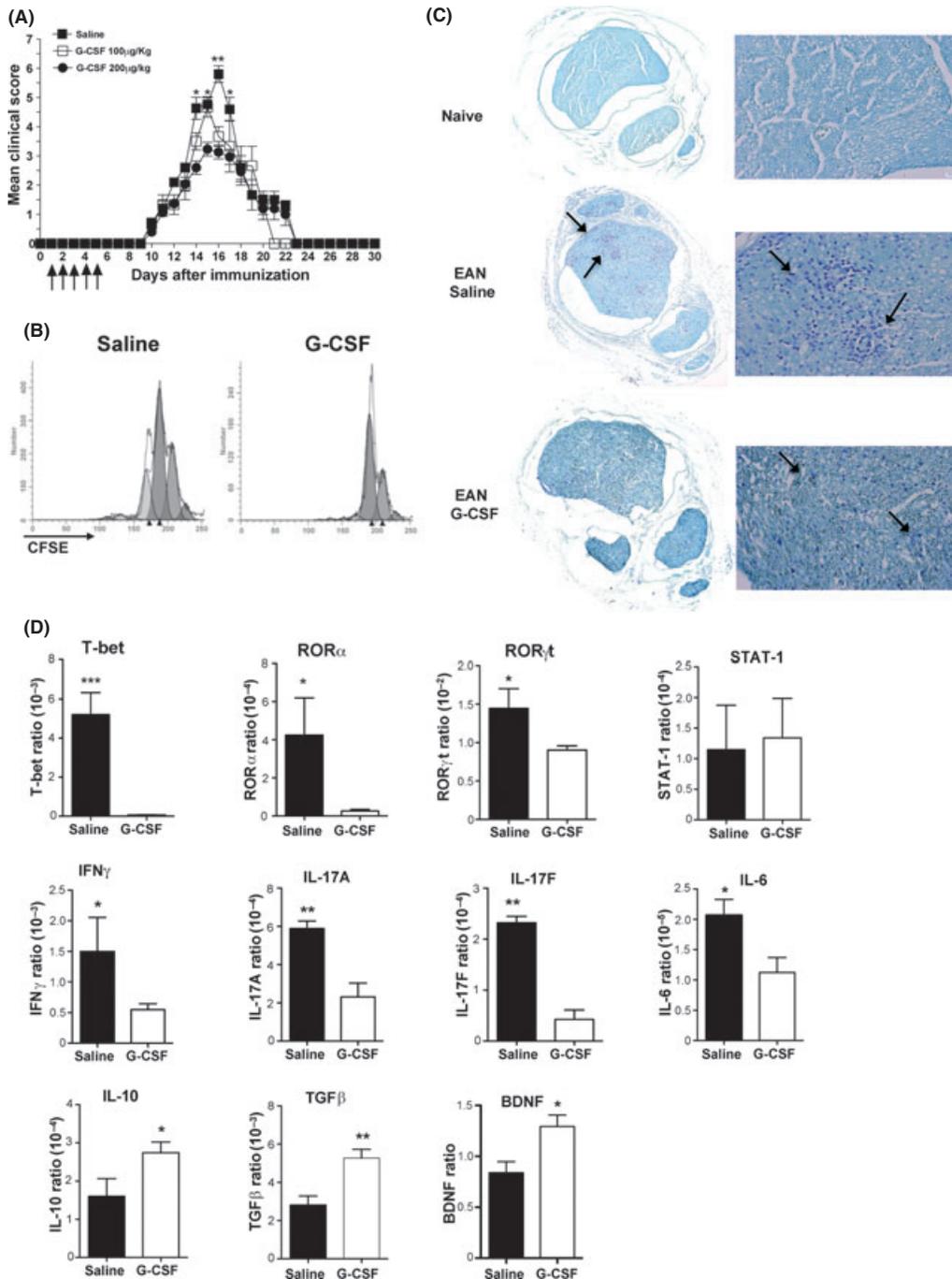
Despite the evolution of treatments in the past decade, acute inflammatory autoimmune diseases of the peripheral nervous system are still a concern due to their considerable morbidity and mortality [1]. Guillain-Barré syndrome (GBS) is an acute inflammatory disorder. The study of experimental autoimmune neuritis (EAN), the experimental model of GBS, has provided most of the knowledge regarding GBS disease mechanisms. Inflammatory lesions are primarily located in the sciatic nerves and the cauda equina of EAN-affected Lewis rats [2]. Lesions are characterized by an accumulation of inflammatory cells, primarily T cells, and macrophages. The inflammatory response during EAN is characterized mainly by the migration of neurotogenic cells into the peripheral nerves and by the production and secretion of proinflammatory cytokines, such as IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-6, and IL-17 [3].

During the last years, hematopoietic factors, such as erythropoietin, granulocyte–macrophage colony-stimulating factor and granulocyte–colony-stimulating factor (G-CSF), have been successfully used to modify experimental autoimmune diseases [4,5]. Moreover, G-CSF has an important and strong tolerogenic function. This cytokine recruits immature dendritic cells (DCs), which induce tolerance through the enhancement of regulatory T cells [5].

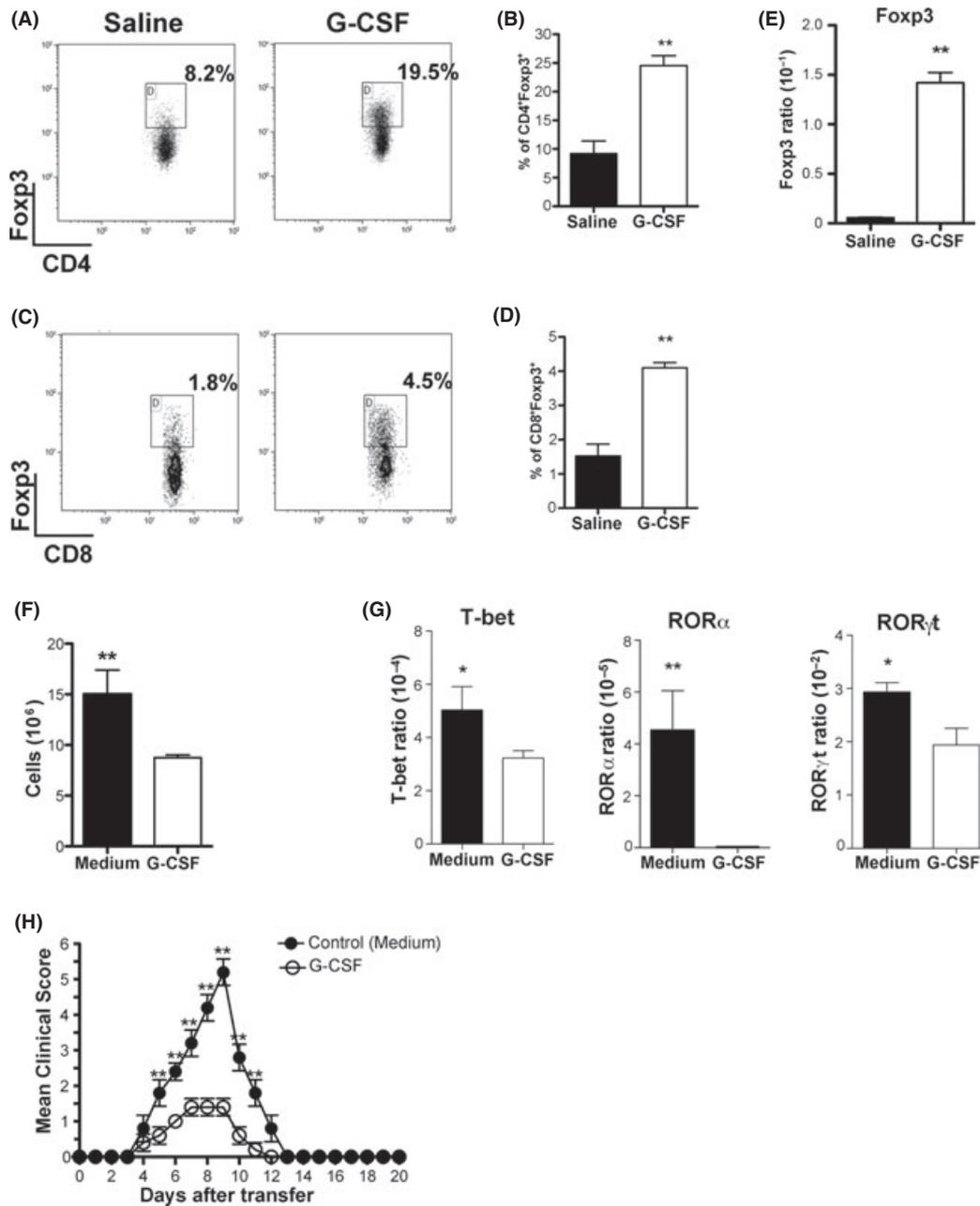
In this study, we investigated the effects of short-term G-CSF treatment on the evolution of EAN. EAN was induced using the neurotogenic peptide P2<sub>53-78</sub> as previously described [6]. The clinical signs of EAN were significantly reduced by the *in vivo* adminis-

tration of G-CSF in a short-term treatment regimen (Figure 1A). The development of EAN is characterized by the sensitization and activation of neurotogenic T cells in the peripheral immune organs. These cells migrate into peripheral nerves and release inflammatory mediators, which may contribute directly or indirectly to the destruction of the myelin sheath. We observed a significant reduction in the specific proliferative response of T cells from Lewis rats with EAN treated with G-CSF compared with the cells from the control animals (Figure 1B). Moreover, G-CSF treatment reduced the mononuclear cell infiltration into the sciatic nerve (Figure 1C).

The EAN autoaggressive response is characterized by the expression and release of Th1 and/or Th17 cytokines. Therefore, we evaluated the expression, by real-time PCR (Figure S1), of Th1 and Th17 cytokines and transcription factors, in the lymph nodes 10 days after immunization, prior to the migration of the neurotogenic cells from the periphery to the target tissue. We observed a consistent downregulation in the expression of the Th1 (T-bet) and Th17 (ROR $\alpha$  and ROR $\gamma$ t) transcription factors in the G-CSF-treated group compared with control group (Figure 1D). Corroborating the changes in the transcription factors expression profile, the expression of proinflammatory cytokines (IFN $\gamma$ , IL-17A, IL-17E, and IL-6) was reduced in the G-CSF-treated group compared with the control group. G-CSF treatment also led to an increase in the expression of anti-inflammatory cytokines, such as IL-10 and



**Figure 1** Clinical evolution of EAN in Lewis rats, which were intraperitoneally administered G-CSF at doses of 200 µg/kg/day (black circle) and 100 µg/kg/day (white square) for 5 consecutive days, starting on day 0. The control group (black squares) received the same volume of sterile PBS for the same period (A). Proliferative response of T lymphocytes (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>), stained with CFSE (after 96h of culture), from the lymph nodes of Lewis rats with EAN treated with saline or G-CSF at a dose of 200 µg/kg/day and stimulated with the P2<sub>53-78</sub> peptide, 5 µM (The result is representative of 3 independent experiments; Fig. S1) (B). Histological sections of the sciatic nerve of a naïve rat and rats from the saline and G-CSF-treated groups (15 days after immunization) stained with Luxol Fast Blue and cresyl violet (arrows indicate inflammatory foci). Transverse sections imaged using an 8× (left column) or 40× objective (right column) (C). Expression of transcription factors (T-bet, ROR $\alpha$ , ROR $\gamma$ t and STAT-1), pro-inflammatory (IFN $\gamma$ , IL-17A, IL-17F and IL-6), and anti-inflammatory (IL-10 and TGF $\beta$ ) cytokines and BDNF in the lymph node cells of rats treated with saline (black bars) or G-CSF (white bars) (D). \**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01 (Mann–Whitney *U*-test).



**Figure 2** Flow cytometric quantification of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T lymphocytes from the lymph nodes (A, representative dot plot; B, mean of 5 independent experiments). Quantification of CD8<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T lymphocytes from the lymph nodes (C, representative dot plot; D, mean of 5 independent experiments). Expression of Foxp3 mRNA in the lymph nodes of rats treated with saline (black bar) or G-CSF (white bar) (E). Proliferative response of neurogenic T lymphocytes. Cells (4 × 10<sup>6</sup>, initial input) were cultured in medium only (black bar) or medium supplemented with 10 ng/mL of G-CSF (white bar) and pulsed with the specific antigen. After 60 h of culture, the cells were stained with trypan blue and counted in a TC10 automated cell counter (BioRad, USA) (F). Real-time PCR analysis of transcription factors (T-bet, ROR $\alpha$  and ROR $\gamma$ t) after 60 h of culture with (black bars) or without (white bars) G-CSF (G). After 60 h of culture, the cells (5 × 10<sup>6</sup>) cultured or not in the presence of G-CSF were adoptively transferred through the intravenous route into a naïve Lewis rat. The clinical scores were then evaluated daily (H). \*P < 0.05; \*\*P < 0.01 (Mann–Whitney test)

TGF $\beta$ <sub>1</sub>, which are the main cytokines produced by regulatory T cells [7].

Regulatory T cells suppress the activation of the immune system and thereby prevent excessive inflammation and/or autoimmunity [7]. Indeed, flow cytometer analysis showed that G-CSF-treated

animals had a higher percentage of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells in the lymph nodes compared with the control group (Figure 2A,B). Moreover, treatment with G-CSF also increased the expression of Foxp3 by CD8<sup>+</sup> T cells (Figure 2C-D). These results indicate that G-CSF treatment enhances, directly or indirectly, through tolerogenic

DCs, the expression of Foxp3 in T lymphocytes (Figure 2E). The increase in the proportion of regulatory T cells seems to be responsible, at least in part, for the suppression of the inflammatory response observed in the treated animals. In fact, other authors and we have shown that the enhancement of regulatory T cells ameliorates autoimmune diseases [7,8].

Interestingly, we also detected an augmentation in the expression of BDNF, a neuroprotective factor, in the lymph nodes of G-CSF-treated group compared with the control group. Indeed, inflammatory cells also secrete this growth factor [9]. Thus, our data suggest that G-CSF acts simultaneously as an anti-inflammatory and a neuroprotective cytokine in the EAN model.

G-CSF is thought to affect the inflammatory response by recruiting immature DCs, which have a tolerogenic profile and enhance the regulatory status of naïve T lymphocytes [5]. To investigate the effect of G-CSF on activated T cells, which may express G-CSFR [9], and/or on mature APCs, we generated neuritogenic P2<sub>53-78</sub>-specific T-cell clones from the immunized animals (Figure S1). We observed a reduction in the proliferative response of neuritogenic T cells cultured in the presence of G-CSF compared with neuritogenic T cells cultured in the absence of G-CSF (Figure 2F). Given the reduction in the proliferative response verified, we evaluated the expression of Th1 and Th17 transcription factors by these cells. The neuritogenic cells cultured in the presence of G-CSF presented a significant decrease in the expression of T-bet, ROR $\alpha$ , and ROR $\gamma$ t. Interestingly, the expression of Foxp3 was not detected in the neuritogenic T cells, cultured with or without G-CSF, *in vitro*. These data suggest that, in addition to the effect on the proliferative response, G-CSF also acts on the activation status of neuritogenic T cells. In order to confirm these

results, we have adoptively transferred an equal number ( $5 \times 10^6$ ) of neuritogenic T cells cultured or not in the presence of G-CSF. The adoptive transfer of these autoreactive T cells normally induces EAN in naïve Lewis rats. We observed a reduction of the disease severity in the animals that received G-CSF-cultured T cells compared with the animals that received the control T cells (Figure 2H). These results indicate that G-CSF may act either on the mature APCs and/or on activated T lymphocytes.

Our results clearly demonstrate that short-term treatment with G-CSF significantly reduces the clinical manifestation of EAN, with concomitant reduction in the activation of neuritogenic T cells both *in vitro* and *in vivo*. The reduction in the function of autoreactive T cells may be explained by the increase in the proportion of Foxp3+ T cells and anti-inflammatory cytokines in the draining lymph nodes of treated animals and by the direct effect of the G-CSF on the neuritogenic T-cell activation.

## Acknowledgments

The authors would like to acknowledge Dr. Aureo Tasumi Yamada for his assistance with histology. This work was supported by grants from FAPESP (#2011/18728-5 and 2012/04565-0). ASF was supported by FAPESP grant #2012/01408-0. FP and MPAS were supported by FAPESP grants #2011/15175-5 and #2011/15639-1, respectively.

## Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

- Hartung HP, Pollard JD, Harvey GK, Toyka KV. Immunopathogenesis and treatment of the Guillain-Barre syndrome—Part I. *Muscle Nerve* 1995;**18**:137–153.
- Waksman BH, Adams RD. Allergic neuritis: an experimental disease of rabbits induced by the injection of peripheral nervous tissue and adjuvants. *J Exp Med* 1955;**102**:213–236.
- Lu MO, Zhu J. The role of cytokines in Guillain-Barre syndrome. *J Neurol* 2011;**258**:533–548.
- Sheng JR, Muthusamy T, Prabhakar BS, Meriggioli MN. GM-CSF-induced regulatory T cells selectively inhibit anti-acetylcholine receptor-specific immune responses in experimental myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* 2011;**240–241**:65–73.
- Hamilton JA. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2008;**8**:533–544.
- Castro FR, Farias AS, Proenca PL, et al. The effect of treatment with crotapotin on the evolution of experimental autoimmune neuritis induced in Lewis rats. *Toxicol* 2007;**49**:299–305.
- Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008;**133**:775–787.
- Farias AS, Spagnol GS, Bordeaux-Rago P, et al. Vitamin D3 induces IDO+ tolerogenic DCs and enhances treg, reducing the severity of EAE. *CNS Neurosci Ther* 2013;**19**:269–277.
- Kerschensteiner M, Gallmeier E, Behrens L, et al. Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *J Exp Med* 1999;**189**:865–870.
- Franzke A, Piao W, Lauber J, et al. G-CSF as immune regulator in T cells expressing the G-CSF receptor: implications for transplantation and autoimmune diseases. *Blood* 2003;**102**:734–739.

## Supporting Information

The following supplementary material is available for this article:

**Figure S1.** Flow cytometry analysis of CFSE dilution from CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T lymphocytes (mean of 3 independent experiments)

from the lymph nodes of control and G-CSF-treated group. Seven generations were detected in the control group and five in the G-CSF-treated group. \**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01 \*\*\**P* < 0.001 (Mann-Whitney *U*-test).