

Patrícia Mara da Costa



**Estudo das Citocinas Produzidas Por Células do Sangue Periférico de Pacientes Portadores de Esclerose Múltipla nos Surtos e Remissões.**

Este exemplar corresponde à redação final da tese, defendida pelo(a) candidato(a) Patrícia Mara da Costa e aprovada por a Comissão Julgadora

12/11/97



Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas na Área de Imunologia.

**Orientador: Profa. Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos**

**Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas**

-Campinas-

São Paulo-Brasil  
1997

C823e  
33014/BC

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

7805651

DATA	BC.
CHAMADA:	UNICAMP
	C823e
EX	
MSO BC/	33014
DC.	395/98
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
ECO	R\$ 18,00
PA.	10/03/98
CPD	

CM-00106578-3

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

**Costa, Patrícia Mara da**

C823e

Estudo das citocinas produzidas por células do sangue periférico de pacientes portadores de esclerose múltipla nos surtos e remissões/  
Patrícia Mara da Costa. -- Campinas, SP: [s.n.], 1997.  
76f. ilus.

Orientadora: Leonilda Maria Barbosa dos Santos  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas,  
Instituto de Biologia.

1. Auto-imune. 2. Linfócitos. 3. Esclerose. I. Santos, Leonilda  
Maria Barbosa dos. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de  
Biologia. III. Título.

Campinas, 23 de Novembro de 1997.

**BANCA EXAMINADORA:**

**TITULARES:**

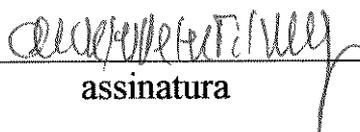
Profa. Dra. Leonilda M.B. Santos (orientador)



---

assinatura

Prof. Dr. Charles Peter Tilbery



---

assinatura

Prof. Dr. Sílvio Luís de Oliveira



---

assinatura

**SUPLENTES:**

Prof. Dr. Paulo M.F. Araújo

---

assinatura

*Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro recebido da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.*

*(FAPESP)*

“ *Muitas vezes- lutando contra os obstáculos de toda a ordem, ou sentindo minhas forças falharem e achando difícil perseverar no caminho escolhido- um secreto sentimento murmurava dentro de mim: existem poucas pessoas contentes e felizes aqui na terra: talvez teu trabalho possa, um dia, ser a fonte onde os fracos, abatidos e sobrecarregados, encontrem alguns momentos de repouso e bem-estar*”.

(Haydn)

“ *Para ser grande, sê inteiro: nada Teu exagera ou exclui. Sê todo em cada coisa. Põe quanto és em tudo o que fazes. Assim em cada lago a lua toda brilha, porque alta vive.*”

(Fernando Pessoa)

## A Deus

“Aquele que sonda o meu interior me conhece por dentro sabe como eu sou, conhece os meus intentos e em tudo me faz viver (...)” .

“Fé é acreditarmos no que não vemos e a recompensa dessa fé é vermos aquilo em que acreditamos”.

“ *Se* um dia, já homem feito e realizado, sentires que a terra cede aos teus pés, e que tuas obras desmoronam, que não há ninguém a tua volta para te estender a mão, esquece a tua maturidade, passa pela tua mocidade, volta a tua infância e balbucia, entre lágrimas e esperanças, as últimas palavras que sempre te restarão na alma: minha mãe, meu pai, somo-lhes gratos. ”

(Rui Barbosa)

Aos meus pais Sandra e Luiz e meus avós pelo carinho, apoio, confiança, por estarem comigo em todos os momentos e por possibilitarem que eu pudesse ser o que sou.

“ *C*ada um que passa em nossa vida passa sozinho, pois cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra. Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, mas não vai só e nem nos deixa só; leva um pouco de nós mesmos; deixa um pouco de si mesmo. Este constante compartilhamento é a maior responsabilidade de nossa vida e a prova evidente é que duas almas não se encontram ao acaso ”.

(Antoine de Saint-Exupéry)

“ *M*ais alto sobe aquele que ajuda o outro a subir”.

**A vocês amigos especiais:**

Anália Bignami, Haracaúna  
Pereira, Edson Coayla, Blanca  
Bardales, Sérgio Torres, Ricardo  
Almeida, Janete Moscardi, John  
Infantis, Inês, Vera Salazar, Yumi  
Hiraki e Newton Santos.

“ **S**er mestre é ser orientador e amigo, guia e companheiro, é caminhar com o aluno, passo a passo. É transmitir os segredos da caminhada. Aprendemos aos poucos a necessidade de aprender e somos gratos àqueles que se dedicaram à tarefa de nos ensinar.”  
Obrigado!

**À professora e amiga:**

Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos

“ Há pessoas que passam por este mundo e delas pouco se fica conhecendo. Vivem sua vida, mas não deixam rastros. Outras queriam ou não, conscientes ou inconscientes, vão deixando as marcas que as identificam, os traços que perpetuam o seu nome e as tornam inconfundíveis” .

“ O homem que escreveu seu nome em papéis, o tempo dará conta de apagá-lo, mas aquele que gravar o nome em um coração humano, o perpetuará, porque um homem o transmitirá a outro homem.”

**Aos professores e amigos especiais:**

Marcello e Lígia Simões e Fernando Guimarães

## **Agradecimentos**

A Deus, que sempre me conduziu, indicando-me as direções corretas e as melhores decisões e sem o qual eu não seria o que hoje sou e o que consegui.

Aos meus pais Sandra e Luís por tudo que me deram até hoje e por tudo o que tenho e sou.

À Profª Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos pela amizade, oportunidade, confiança e por participar na minha formação.

Ao Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) pela oportunidade do desenvolvimento deste trabalho e pela concretização de mais esta etapa de minha carreira.

Aos Departamentos de Neurologia da Faculdade de Ciências Médicas do Hospital das Clínicas da UNICAMP e da Santa Casa de São Paulo por permitirem que avaliássemos seus pacientes portadores de Esclerose Múltipla.

Aos pacientes portadores de Esclerose Múltipla que possibilitaram com seu espírito humanitário e boa vontade que este estudo pudesse ser realizado.

Aos Professores Paulo Maria Ferreira Araújo, Wirla Maria Cunha Tamashiro, Dagmar Ruth Stach Machado, Júlia Keiko Sakurada, Irineu J.B. Camargo, Dra. Liana Verinaud, Dra. Maria Helena Kramer pelos ensinamentos, pela amizade e por contribuírem para mais esse passo da minha formação.

Ao Dr. Carlos Augusto Senne e Dr. Rubens de Castro (laboratório Senne), Dr. Benito Damasceno, Dr. Jayme Antunes Maciel (FCM-UNICAMP) Dr. Charles Peter Tilbery (Santa Casa-S.P.), Dra. Ivamara Costa e Dr. Nubor Orlando Facure (Instituto do Cérebro-Campinas-SP) por gentilmente fornecerem material para este estudo, pelo apoio e participação neste trabalho.

Ao Dr. Ernani P. Maciel pela amizade, pela participação e por possibilitar que o estudo do pacientes fosse possível, acompanhando ativamente este estudo.

A Profa Dra. Maria Heloisa S.L. Blotta pela amizade, pela disponibilidade em ajudar, por participar de uma etapa de desenvolvimento deste trabalho e por fornecer gentilmente IL-4 utilizada neste estudo.

Aos Funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia por toda amizade e companherismo, especialmente Lúcia, Francisco, Airton, Sr. Antônio, Cristina, Dirce e também Lurdes, Márcia, Daniela, Sr. Guilherme (*in memoriam*).

Aos funcionários do Instituto de Biologia da UNICAMP, em especial Lúcia do xerox CAB e Sílvia da SGPG

Aos professores Dr. Charles Peter Tilbery (Santa Casa-S.P.), Dr. Sílvio Luís de Oliveira (UNESP-Botucatu) e Dr. Paulo M.F. Araújo (UNICAMP) pelo apoio, pela revisão do texto e sugestões para a melhoria deste trabalho.

Aos Médicos e Enfermeiros dos Departamentos de Neurologia da FCM-UNICAMP e Santa Casa de São Paulo pelo apoio e amizade e pela participação, em particular às enfermeiras Sra. Leda e Fernanda do Ambulatório de Neurologia da UNICAMP.

A Secretária e amiga Ana Adélia do Curso de Pós-Graduação em Neurociências por sua amizade, compreensão e apoio.

A todos os colegas e amigos do Departamento de Microbiologia e Imunologia por participarem durante algum tempo de minha vida, de minha formação com sua amizade e compreensão, em especial ao amigo Edson Delgado.

Às amigas do Laboratório 4: Blanca, Sílvia, Crisitiane, Eloísa, Elaine, Anália, Paula, Luciana, Célia, Karina e Renata e Sra. Ignês pelo companherismo e amizade, incentivo tanto nos bons quanto nos momentos difíceis desta caminhada.

A minha amiga Blanca Bardales por participar de todas as atividades comigo, incluindo a participação na redação deste trabalho e também por toda a sua amizade, companherismo, incentivo e união ao longo desta etapa.

Ao amigo Haracaúna Pereira por toda sua ajuda, tanto pelas longas horas de trabalho durante a confecção da tese como no laboratório e na própria vida, participando com palavras de otimismo, companherismo, incentivo, apoio, amizade, estando sempre presente nos momentos difíceis e alegres.

Ao amigo Sérgio Torres pela participação, fornecendo gentilmente a primeira análise estatística deste trabalho e também por toda a sua compreensão, apoio, amizade, carinho, pelas palavras de incentivo e por ter estado ao meu lado em momentos difíceis e alegres.

Ao amigo Edson Coayla por me apoiar em vários momentos, incentivando, participando, principalmente na fase final deste trabalho, pela sua amizade, coragem, compreensão, carinho e dedicação e apoio constantes.

Aos amigos Luciana de Moraes e Prof. Dr. Osvaldo Augusto Santana pelo apoio, amizade, incentivo durante todo este período.

Ao Prof Dr. Marcello Guimarães Simões e sua esposa Profa. Lígia Barroso Simões (UNESP) por toda amizade , apoio, carinho, compreensão, pelo incentivo à carreira científica, por participarem de minha formação de uma maneira ativa e fraterna, tanto durante a graduação quanto durante a pós-graduação.

Ao Prof Fernando Guimarães pela sua amizade, apoio e incentivo durante todo esse tempo e também por em alguma época ter participado da minha formação, sempre estando pronto a estender sua mão amiga e participar seus conhecimentos.

À Dra. Tereza Samico Cavalcanti e Dr. Ricardo Zholner pela amizade e apoio na fase anterior a este trabalho, mas que contribuíram muito para minha formação.

Aos amigos Analía Bignami, Janete Moscardi, John Infantis, Luís Fernando Barbisan, Eduardo Diniz e Newton dos Santos, Yumi Hiraki, Vera Lúcia Salazar pela grande e especial amizade, apoio e incentivo constante durante várias etapas de minha vida tanto pessoal, quanto profissional.

A amiga Inês (em particular), Carlos e André por toda ajuda, carinho, incentivo, amizade, compreensão durante não só o período de desenvolvimento deste trabalho, mas ao longo de toda minha vida de um modo geral.

A minha família, em especial meus avós Oscarina e Venâncio e tios (Marlene, Maria, Ana Lúcia, Venâncio, Mara e Landa) e primos (em particular César) por todo carinho, apoio e compreensão, por acreditarem em mim e na minha capacidade e por sempre estenderem a mão quando precisei .

Aos Meus irmãos Ádamo e Roberta pela amizade e pelo companherismo.

A todas as pessoas que de alguma maneira participaram deste trabalho de maneira direta ou indireta.

À aluna de graduação Clarissa pela ajuda nas dosagens de  $\text{TNF}\alpha$ , uma das citocinas utilizadas neste estudo.

## Abreviaturas.

E.M.	Esclerose Múltipla
E.A.E.	Encefalomielite Experimental Autoimune
CSF	Líquido Céfal Raquidiano
PHA	Fitohemaglutinina
MBP	Proteína Básica de Mielina
PLP	Proteolipoproteína
TGF- $\beta$	Fator Transformador de Crescimento $\beta$
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral $\alpha$
IFN- $\gamma$	Interferon Imune
IL	Interleucina
ConA	Concanavalina A
PBS	Solução Salina Tamponada
SBF	Soro Bovino Fetal
LPS	Lipopolissacarídeo (cápsula de <u>E. coli</u> )
BSA	Soroalbumina bovina
SNC	Sistema Nervoso Central
PMNC	Células Polimorfonucleares
APC	Células Apresentadoras de Antígeno
Ag	Antígeno

# ÍNDICE

	<b>PÁG.</b>
<b>I.</b> Introdução-----	<b>1</b>
Objetivos-----	<b>9</b>
<b>II.</b> Materiais e Métodos-----	<b>10</b>
2.1.Casuística-----	<b>10</b>
2.2.Anticorpos e Citocinas-----	<b>10</b>
2.3.Obtenção de Proteína Básica de Mielina Humana (MBP)----	<b>11</b>
2.4.Obtenção de Células Mononucleares-----	<b>11</b>
2.5.Produção de Citocinas-----	<b>11</b>
2.6.Obtenção de TNF $\alpha$ de Pacientes Portadores de Esclerose Múltipla e Indivíduos Normais.-----	<b>11</b>
2.8.Quantificação de Citocinas-----	<b>12</b>
2.8.1.Quantificação dos Níveis de TNF $\alpha$ -----	<b>12</b>
2.8.2.Quantificação dos Níveis de IFN $\gamma$ -----	<b>13</b>
2.8.3.Quantificação dos Níveis de IL-4-----	<b>14</b>
2.8.4.Quantificação dos Níveis de IL10-----	<b>15</b>
2.8.5.Quantificação de TGF $\beta$ -----	<b>16</b>
<b>III.</b> Análise Estatística-----	<b>17</b>
<b>IV.</b> Resultados-----	<b>18</b>
<b>V.</b> Discussão-----	<b>33</b>
<b>VI.</b> Conclusões-----	<b>39</b>
<b>VII.</b> Apêndice-----	<b>40</b>
<b>VIII.</b> Referências Bibliográfica-----	<b>52</b>

INTRODUÇÃO

As características clínicas e patológicas da Esclerose Múltipla foram descritas por Charcot em 1868 (McFARLIN & McFARLAND, 1982). O termo esclerose múltipla, esclerose em placas ou disseminada foi usado para descrever a ampla distribuição de lesões da substância branca do Sistema Nervoso Central ( SNC ). As lesões na Esclerose Múltipla podem ser encontradas próximo à circulação sanguínea, nas áreas perivasculares, tendem a ser simétricas, havendo infiltrado de macrófagos, linfócitos e plasmócitos (HAFLER & WEINER, 1989; McFARLIN & McFARLAND, 1982). A E.M. pode ser, portanto, descrita como uma reação inflamatória, que resulta na desmielinização dos axônios da substância branca do SNC. Clinicamente apresenta característica de doença crônica, que usualmente progride por anos ou décadas, nas formas de surto-remissão ou crônica progressiva primária e secundária (NAVIKAS & LINK, 1996).

A E.M. é uma doença de jovens e adultos, sendo que a maioria dos pacientes descrevem seus primeiros sintomas entre as idades de 20-40 anos. Raramente a doença aparece antes dos 15 ou depois dos 50 anos, embora algumas exceções tenham sido relatadas (LYNCH & ROSE, 1996). O aparecimento dos surtos são extremamente indesejáveis, pois promovem o declínio da qualidade de vida do paciente.

A etiologia da E.M. não é conhecida. A hipótese mais aceita é que a doença seja resultado de algum evento infeccioso em indivíduos susceptíveis ao desenvolvimento de doenças autoimunes. Atualmente, a maioria dos estudiosos aceita que a E.M. possa ser enquadrada como doença de natureza autoimune (WAKSMAN, 1985). Infecções virais, ou por outro agente e mesmo os superantígenos estão implicados na gênese das doenças autoimunes. A maioria das doenças autoimunes está associada com um ou múltiplos genes, no entanto, os fatores ambientais também devem ser considerados. Estudos realizados em gêmeos monozigóticos mostraram que o aumento do risco de contrair a E.M. era muito variável e dependia muito dos fatores ambientais (EBERS et al., 1987). Um dos possíveis mecanismos pelos quais os vírus ou outros agentes infecciosos levam ao desenvolvimento da doença autoimune, seria através do mimetismo molecular, onde o agente infeccioso apresentaria estruturas que mimetizariam as proteínas do hospedeiro. Uma resposta imune dirigida contra o patógeno poderia eliminá-lo, mas simultaneamente reagiria com um ou mais antígenos próprios do organismo, num processo crônico. Em

trabalho, recentemente realizado, os autores testaram um painel de 129 peptídeos derivados de bactérias ou vírus, contra clones de células T específicos para proteína básica de mielina (MBP) e mostraram que vários destes peptídeos foram capazes de ativar os clones de células T (WUCHERPFENNING & STROMINGER, 1995). A maior dificuldade em se estabelecer a correlação entre o agente infeccioso e o aparecimento da doença autoimune se deve ao longo tempo que precede o aparecimento do quadro clínico.

A autoimunidade é entendida atualmente, como um mecanismo fisiológico normal. Células reativas e anticorpos contra os diferentes componentes do organismo foram descritos em indivíduos normais. O organismo convive com os clones auto-reativos e autoanticorpos sem que os mesmos levem a qualquer tipo de dano. As doenças autoimunes teriam início quando os mecanismos de tolerância aos antígenos próprios fossem desequilibrados em indivíduos geneticamente predispostos. Reforçando essa idéia, alguns autores mostraram a presença de clones reativos a componentes da mielina, com igual frequência em indivíduos normais e em pacientes portadores de E.M. (OTA et al., 1990; ZHANG et al., 1992).

Uma série de mecanismos imunoreguladores estão envolvidos na manutenção da tolerância aos antígenos próprios, sendo os mais estudados a deleção de clones auto-reativos, a anergia clonal e mecanismos reguladores da resposta imune exercidos pelas citocinas.

A deleção de clones auto-reativos tanto pode ocorrer no timo como na periferia, sendo a apoptose o mecanismo melhor descrito. Apoptose é a palavra empregada para descrever a seqüência de eventos morfológicos no processo de morte celular, que envolve a fragmentação nuclear e diminuição do volume da célula, com posterior fagocitose dos fragmentos celulares. Como a morte celular programada é desencadeada não está muito claro, mas há evidências de que altas doses do auto-antígeno, superantígenos ou até mesmo antígenos exógenos possam causar a deleção de linfócitos imunocompetentes, através da apoptose. Esta forma de morte celular não envolve necrose, não implicando portanto, na destruição da arquitetura do tecido.

Na anergia clonal, outro mecanismo de indução de tolerância imunológica, observa-se que linfócitos T imunocompetentes, que escaparam à seleção negativa do timo,

migram para a periferia, mas não respondem ao auto-antígeno. Para a célula T ser ativada, não é suficiente a ligação do TCR com o antígeno específico ligado às moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe I ou II . São necessários outros sinais estimulatórios, provenientes da interação de uma variedade de pares de receptores e contra-receptores. Os pares de moléculas co-estimulatórias melhor caracterizadas são o B7.1 (CD80), B7.2 (CD86) expressos nas células apresentadoras de antígeno e CD28/CTLA-4 expressos nos linfócitos T. A interação do CD3/TCR com o complexo antígeno - MHC, na ausência de co-estimulação, não somente levaria à falha na indução da resposta imune, mas resultaria na inativação funcional das células T maduras, levando-as a um estado de anergia.

As citocinas que são produzidas no processo de ativação linfocitária participam ativamente tanto na potencialização da resposta imune, como na indução de tolerância aos antígenos próprios. O modelo Th1 / Th2 para diferenciação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> propõe que após a ligação com antígeno, as células T helper diferenciam-se em duas sub-populações que são caracterizadas pelo padrão de citocinas secretadas. Os linfócitos CD4<sup>+</sup> Th1 secretam principalmente IL2 e IFN $\gamma$ , ativam macrófagos e mediam reações de hipersensibilidade do tipo tardio. Os linfócitos CD4<sup>+</sup> Th2 produzem IL4, IL5 e IL10, são importantes na síntese de IgE e podem suprimir a resposta imune celular. As citocinas produzidas por cada um dos subgrupos de linfócitos atuam como seu próprio fator de crescimento, assim como podem regular negativamente o desenvolvimento e a função do subtipo oposto. Este modelo de regulação cruzada tem sido utilizado, com sucesso, para explicar vários fenômenos imunológicos, inclusive a resposta imune a agentes infecciosos (MOSMANN et al., 1986; SHER & COFFMAN, 1992; PAUL & SEDER, 1994; ROMAGNANI, 1994). A polarização de um ou outro fenótipo também parece ser extremamente relevante nos mecanismos de autoimunidade.

Todo conhecimento somado sobre a resposta imune na Esclerose Múltipla decorreu, principalmente, de estudos desenvolvidos no modelo experimental, a encefalomielite experimental autoimune (E.A.E.). A E.A.E apresenta várias características em comum com a E.M. humana, tendo sido, portanto, exaustivamente estudada. Está muito bem descrito na literatura, que a E.A.E. é causada por linfócitos T. Mais

recentemente foi demonstrado que a transferência adotiva de linfócitos T CD4<sup>+</sup> Th1, específicos para componentes da mielina podem causar E.A.E. (ZAMVIL & STEINMAN, 1990). Da mesma forma, no modelo de Diabetes experimental obtida em camundongos NOD (“non obese diabetes”), a transferência adotiva de linfócitos T CD4<sup>+</sup> do tipo Th1, específicos para antígenos pancreáticos, podem causar a doença, enquanto linfócitos específicos para o mesmo antígeno, do tipo Th2, protegem contra a mesma (KATZ et al., 1995). Estes achados, entre outros, apoiam a conclusão que a EAE, a diabetes experimental e, provavelmente outras doenças autoimunes órgão-específicas são causadas por clones de linfócitos auto-reativos que apresentam o padrão Th1.

Baseado nesses dados, supõe-se que nesses modelos as células Th2, com a mesma especificidade para o antígeno, deveriam inibir o desenvolvimento da doença. Os resultados obtidos em vários laboratórios, no entanto, foram conflitantes. No modelo para E.A.E., a transferência de clones de linfócitos Th2, específicos para neuroantígenos, não foi capaz de proteger contra a doença. Por outro lado, CHEN et al. (1994) obtiveram proteção contra a E.A.E. transferindo adotivamente os clones Th2 e Th3 (produtores de TGF β). A administração, “in vivo” de citocinas produzidas pelos linfócitos Th2, como a IL4, IL10 e IL3, resultou na melhora clínica, diminuição da desmielinização e indução de células Th2 (RACKE et al., 1994). Demonstrou-se também, que a tolerância obtida pela administração oral de componentes da mielina se deve à ativação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> capazes de produzir IL4 e TGF β (KARPUS et al., 1992; CHEN et al., 1994).

Observações de vários laboratórios, utilizando células de pacientes portadores de E.M., têm sugerido a participação de TNF α e IFN γ na patogênese da doença. Em estudos utilizando-se tecido cerebral de pacientes portadores de E.M., determinados autores encontraram IFN γ associado à expressão de antígenos de classe II nos astrócitos das margens das lesões, com infiltração de linfócitos CD4 expressando níveis aumentados de receptores para IL2 (TRAUGOTT & LEBON, 1988). Utilizando técnicas de imunohistoquímica nas lesões agudas e crônicas da E.M., SELMAJ et al. (1991) puderam identificar TNF α e TNF β, não detectando porém, a presença destas citocinas no sangue periférico. Trabalhos mais recentes sobre a participação das citocinas e moléculas co-estimulatórias no tecido cerebral de pacientes com E.M. mostraram que as moléculas B

7.1 e B 7.2 e IL12 p 40 predominavam nas placas de E.M. na fase aguda da doença. As moléculas B 7.1 foram identificadas nas áreas de inflamação perivenular, enquanto que não foram detectadas na área do parênquima normal. Estes achados sugerem que nos eventos iniciais da inflamação na E.M., as moléculas co-estimulatórias e IL12 participam ativamente, criando um microambiente com condições ótimas para o desenvolvimento das células Th1 (WINDHAGEN et al., 1995). Estudos empregando hibridização “in situ” para detectar RNA mensageiro das citocinas presentes no cérebro de pacientes com E.M. foram efetuados para IL1 $\beta$ , IL2, IL4, IL6, IL10, TNF  $\alpha$  e TGF  $\beta_{1,2}$ . Os autores demonstraram a presença de mRNA para todas as citocinas, sendo que nas regiões com desmielinização inflamatória predominavam TNF $\alpha$ , IFN  $\gamma$  e IL6, enquanto que nas regiões com lesões inflamatórias, sem desmielinização, pequena quantidade de IFN  $\gamma$  e IL2 foi detectada. Estas citocinas estavam localizadas nas regiões perivasculares, onde se observou infiltrado celular, mas não no tecido do parênquima, reforçando a idéia de que a desmielinização se deve às células circulantes que atravessam a barreira hemato-encefálica (WOODROOFE & CUZNER, 1993).

Estudos dos níveis de citocinas quantificadas diretamente no líquido céfalo-raquidiano estão sendo realizados. SHARIEF & HENTEGES (1991) mostraram aumento dos níveis de TNF  $\alpha$  no CSF de cerca de 50% dos pacientes com E.M. crônica-progressiva, comparada aos pacientes com a doença estável, que não apresentaram níveis detectáveis, o mesmo valendo para indivíduos normais. Resultados similares foram encontrados por TSUKADA et al. (1991). MAIMONE et al. (1991) encontraram níveis superiores a 140 pg/ml de TNF  $\alpha$  no CSF de pacientes portadores de E.M., em 23% dos pacientes estudados, assim como em 29% de outras doenças neurológicas inflamatórias.

Em estudo desenvolvido com células derivadas do sangue periférico de pacientes na fase ativa da doença, utilizando a metodologia do PCR, RIECKMANN et al. (1995) mostraram níveis elevados de TNF  $\alpha$ . Utilizando clones de linfócitos derivados do sangue periférico, MOKHTARIAN et al. (1994) também reportaram aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias (IL2, IFN $\gamma$ , TNF  $\alpha$  / TNF  $\beta$ ) em linhagens celulares. Os mesmos autores também demonstraram que na fase ativa da doença havia diminuição significativa da produção de TGF  $\beta$ , sendo que os linfócitos CD8<sup>+</sup> e CD 45 RA eram a

principal fonte dessa citocina. Em estudo longitudinal, onde se pesquisou a expressão de mRNA em pacientes com a doença na forma de surto/remissão, foi verificado que o aumento da expressão de mRNA para TNF  $\alpha$  precede, cerca de 4 semanas, o aparecimento do surto, enquanto os níveis de IL10 e TGF  $\beta$  estão diminuídos. Este mesmo grupo não conseguiu correlacionar o grau de atividade da doença com os níveis de IL1, IL4, IL6, IFN  $\gamma$  (RIECKMANN et al., 1994). Alguns autores pesquisaram a possível correlação entre linfócitos que expressavam o haplótipo HLA-DR2, que é um marcador associado à susceptibilidade ao desenvolvimento da E.M. com a produção de TNF  $\alpha$ . Os resultados mostraram que linhagens de células T, de pacientes DR2-positivo, provavelmente devido à ligação genética com o locus para genes de TNF  $\alpha$  no cromossomo 6, produziram maior quantidade de TNF  $\alpha$  que os linfócitos do grupo de indivíduos DR2- negativo (ZIPP et al., 1994). Esse autores porém, não encontraram diferença significativa com relação aos níveis de IFN  $\gamma$ .

Clones de linfócitos T, específicos para MBP, derivados do sangue periférico e do líquido céfalo-raquidiano de pacientes portadores de E.M., outras doenças neurológicas de caráter não inflamatório e grupo controle normal foram estudados com relação à produção de citocinas. Foi verificado que a maioria dos clones apresentaram o padrão Th0 com relação às citocinas produzidas e nenhum clone apresentou o padrão Th2. Muito interessante foi a observação que acima de 74% dos clones derivados de pacientes portadores de E.M. apresentaram o padrão Th1, não sendo isolado nenhum clone, com esse padrão, de indivíduos normais ou de outras doenças neurológicas de caráter inflamatório (BROD et al., 1991). Testando diferentes neuroantígenos, inclusive peptídeos da molécula de MBP, outro grupo de autores mostrou aumento do número de células secretoras de IFN  $\gamma$ , tanto no sangue como no CSF de pacientes com E.M. (OLSSON et al., 1993).

Linhagens de células reativas a outros neuroantígenos componentes da mielina também foram testadas com relação à capacidade de produzir citocinas. Clones de linfócitos reativos à proteolipoproteína (PLP) de pacientes com E.M., na fase aguda da doença produziram maior quantidade de IFN  $\gamma$  e TNF  $\alpha$  / TNF  $\beta$ , enquanto que os clones dos mesmos pacientes estudados na fase da remissão da doença produziram, com maior

freqüência, TGF  $\beta$  e IL10 (CORREALE et al., 1995).

Com relação à atuação das citocinas liberadas pelos clones de linfócitos Th2 sobre o desenvolvimento da E.A.E. e E.M., uma série de evidências mostram que as citocinas como IL4, IL10 e TGF  $\beta$  podem inibir a reação inflamatória desencadeada pelas células Th1. Estudos imunohistoquímicos, realizados no tecido cerebral de animais com E.A.E., mostraram a presença de IL2, TNF  $\alpha$  e IFN  $\gamma$ , não encontrando, no entanto, níveis detectáveis de IL4 durante a fase aguda da doença (MERRIL & BENVENISTE, 1996; KHOURY et al., 1992). Por outro lado, os níveis de IFN  $\gamma$  decresciam e se tornavam mesmo, não detectáveis, nos animais em recuperação, enquanto que os níveis de IL4, IL10 e TGF  $\beta$  aumentavam nesta fase da doença (KHOURY et al., 1992; KENNEDY et al., 1992).

Também foi demonstrado que o tratamento “in vivo” com anticorpo anti-TNF  $\alpha$  ou com pentoxifilina, uma droga que seletivamente suprime a produção de citocinas associadas à subpopulação Th1, mas não Th2, inibe a indução da E.A.E. (RUDDLE et al., 1990).

A interleucina 10, originalmente conhecida com fator inibidor da síntese de citocinas (CSIF) é um homodímero de 35-40 KDa produzida por linfócitos do tipo Th2 e atua inibindo a síntese de outras citocinas produzidas por linfócitos do tipo Th1. No modelo da E. A. E., a presença dessa citocina foi detectada no tecido cerebral de animais na fase de remissão da doença (KHOURY et al., 1992; KENNEDY et al., 1992). Também foi observado por CHERNOFF et al. (1995) que na E.A.E. a IL10 suprimia a produção de TNF $\alpha$  por células T específicas para MBP e a expressão de moléculas MHC de classe II induzida por IFN $\gamma$  sobre macrófagos. Observou-se além disso, que a administração sistêmica de IL10 previnha a indução da E.A.E. em ratos (ROTT et al., 1994).

O fator transformador de crescimento  $\beta$  pertence a uma família de polipeptídeos que apresentam a capacidade de, tanto induzir, como inibir a liberação de outras citocinas. Estudos “in vitro” mostraram que o TGF  $\beta$  inibe a proliferação de linfócitos T (KEHRL et al., 1986; SIELP et al., 1988; LEE & RICH, 1991) e atividade das células NK (ORTALDO et al., 1991). O fator transformador de crescimento  $\beta$  (TGF  $\beta$ ) inibe a síntese de citocinas produzidas por macrófagos e diminui a expressão de MHC classe II (ESPEVIK et al., 1987; CZARNIECKI et al., 1988). O TGF  $\beta$  também inibe a

proliferação de células T dependentes de IL2 e expressão de receptores para IL2 (ORTALDO et al., 1991).

Experimentos mostraram que o TGF  $\beta$  tem a capacidade de antagonizar a ação do IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$  (TISUNAWAKI et al., 1988). Outros relatos demonstraram a capacidade do TGF  $\beta$  de inibir a liberação de citocinas pelas células Th1. Além disso, foi demonstrado que a administração de TGF $\beta$  reduz significativamente a migração de linfócitos para o interior do SNC “in vivo”, de maneira dose-dependente, sugerindo um importante papel dessa citocina na redução da infiltração de linfócitos no SNC na E.A.E. (FABRY et al., 1995). Na E.A.E. foi demonstrado que camundongos oralmente tolerizados com epítopos encefalitogênicos apresentaram aumento na secreção de TGF  $\beta$  (MILLER et al., 1993).

Diante das evidências da importante contribuição das citocinas no controle das doenças autoimunes e dos poucos estudos existentes, em nosso meio, abordando o aspecto imunológico das doenças autoimunes do sistema nervoso central, e ainda diante da possível utilização da quantificação das citocinas na clínica médica, o presente trabalho teve como objetivo determinar os níveis de citocinas pró e anti-inflamatória produzidas por células do sangue periférico de pacientes portadores de E.M.

OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos:

1. Quantificar as citocinas com ação inflamatória , como TNF  $\alpha$  e IFN  $\gamma$  , produzidas por células do sangue periférico de pacientes portadores de E.M. em surto e remissão.
2. Quantificar as citocinas com ação anti-inflamatórias como IL 4, IL 10, e TGF  $\beta$  produzidas por células do sangue periférico de pacientes portadores de E.M. em surto e remissão.

*MATERIAIS E MÉTODOS*

**2.1.Casuística:** Foram estudados pacientes com Esclerose Múltipla, com diagnóstico definitivo avaliado de acordo com os critérios de POSER et al. (1983), do Departamento de Neurologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e do Departamento de Neurologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo. O grupo controle foi obtido a partir de indivíduos normais, selecionados entre funcionários, alunos e professores da UNICAMP, de acordo com a faixa etária e sexo do grupo estudado.

**2.2.Anticorpos e citocinas:** Como padrão do ensaio biológico para quantificar TGF $\beta$  utilizou-se TGF- $\beta_1$  humano natural ultrapuro (GENZIME, USA). Para a quantificação do TNF- $\alpha$ , foram utilizados anticorpo monoclonal anti-TNF- $\alpha$  humano purificado, obtido em camundongo (Pharmingen,CA,USA), TNF- $\alpha$  humano recombinante obtido em *E. coli* (Pharmingen,CA,USA) e anticorpo monoclonal anti-TNF- $\alpha$  humano biotilado, obtido em camundongo (Pharmingen, CA, USA), IL-10 recombinante humano, obtido em células  $T_{H1}$  infectadas com Baculovírus (Pharmingen, CA, USA), anticorpo monoclonal anti IL-10 humano biotilado, obtido em rato (Pharmingen, CA, USA), anticorpo monoclonal anti-IL-10 humano purificado, obtido em rato (Pharmingen, CA, USA). Anticorpo monoclonal anti IL-4 humano purificado (Pharmingen, CA, USA), anticorpo monoclonal anti IL-4 humano biotilado (Pharmingen, CA, USA), IL-4 humano recombinante (Pharmingen, CA, USA). Anticorpo monoclonal anti IFN- $\gamma$  humano biotilado obtido em camundongo (Pharmingen, CA, USA), anticorpo monoclonal anti IFN- $\gamma$  humano purificado, obtido em camundongo (Pharmingen,CA,USA), IFN- $\gamma$  humano recombinante (Pharmingen,CA,USA).

**2.3.Obtenção de proteína básica de mielina humana (MBP):** A proteína básica de mielina foi obtida de acordo com o método descrito por DEIBLER et al. (1972).

**2.4.Obtenção de células mononucleares:** Sangue periférico dos pacientes com E.M. e de indivíduos normais foi colhido de maneira estéril em tubos heparinizados. As células mononucleares foram obtidas após separação em gradiente de Ficoll-Hypaque (d=1.077).

**2.5.Produção de Citocinas:** As células foram separadas em gradiente de ficoll-hypaque e estimuladas com PHA(10µg/ml) e MBP humana (25µg/ml), por períodos de 48 horas para produção de IL-10 e 72 horas para produção de TGF-β, 40 horas para IL-4 e 60 horas para IFN-γ (ABRAMS et al., 1992; KENNEDY et al., 1992). Tubos estéreis com 1 ml de suspensão de linfócitos receberam os antígenos descritos acima e os mesmos foram colocados em incubadora com sistema de CO<sub>2</sub>. Após o tempo de incubação os tubos contendo a suspensão celular foram centrifugados a 1500 rpm/10 min e os sobrenadantes foram armazenados a - 85 ° C até a realização das determinações.

**2.6.Obtenção de TNFα de pacientes portadores de E.M. e indivíduos normais.**

Os níveis de TNF-α estão sendo quantificados utilizando-se sangue total, de acordo com método descrito por CHOFFON et al (1992). Coleta-se sangue de pacientes portadores de E.M. e de indivíduos normais em tubos estéreis e heparinizados onde são colocados 2 ml de sangue e cada um dos tubos recebe um mitógeno ou antígeno. As células foram estimuladas com PHA (10µg/ml), LPS (0,1µg/ml) e MBP humana (25µg/ml). Os tubos foram colocados em incubadora com sistema de 5% de CO<sub>2</sub>, por período de 2 horas. Os tubos, contendo o sangue, foram centrifugados a 2000 rpm/15 min, e as amostras foram colocadas em pequenas concentrações e conservados a - 85° C até o momento da determinação.

## **2.8. Quantificação de Citocinas:**

### **2.8.1. Quantificação dos Níveis de TNF- $\alpha$ do Plasma de Pacientes Portadores de E.M. em Surto, Remissão e de Indivíduos Normais:**

O anticorpo monoclonal de camundongo anti TNF- $\alpha$  humano purificado (Pharmingen, CA, USA) foi diluído em PBS estéril na concentração de 2.0  $\mu\text{g/ml}$  e adicionado em placas de 96 poços (Costar, USA) com posterior incubação por 18 horas a 4°C. Após este período foram feitas 2 lavagens com PBS/Tween 20 a 0.05% e adicionou-se 200 $\mu\text{l}$  de PBS/SBF 10%, para bloquear as reações inespecíficas, as microplacas foram deixadas por 2 horas a temperatura ambiente. Terminado esse período, lavou-se 3 vezes com PBS/Tween 20 a 0.05%. e, em seguida, foram adicionados 100 $\mu\text{l}$  de plasma dos pacientes portadores de E.M. ou de indivíduos normais, obtido como descrito no item 2.6., e do padrão TNF- $\alpha$  recombinante humano purificado (Pharmingen, CA, USA), nas diferentes concentrações. Novamente a microplaca foi incubada a 4°C por 18 horas. Passado esse tempo, lavou-se 4 vezes com PBS/Tween 20 a 0.05% e adicionou-se 100 $\mu\text{l}$  do anticorpo monoclonal anti TNF- $\alpha$  (camundongo anti-humano) (Pharmingen, CA, USA) marcado com biotina, diluído em PBS/10% SBF (Microbiológica, RJ, Brasil) na concentração 2,0  $\mu\text{g/ml}$ . A placa foi incubada por 45 minutos a temperatura ambiente e, em seguida foram feitas 6 lavagens com PBS/Tween 20 a 0.05% e adicionou-se então 100 $\mu\text{l}$  de avidina - peroxidase (Sigma, USA) diluída a 1:400 em PBS/SBF 10%. Incubou-se a microplaca por 30 minutos a temperatura ambiente. Terminado o período de incubação, lavou-se 8 vezes com PBS/Tween 20 a 0.05% e adicionou-se 100 $\mu\text{l}$  do substrato para peroxidase(OPD, tampão citrato e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), incubando-se por, aproximadamente, 30 minutos. Para bloquear a reação, adicionou-se H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N. As leituras foram realizadas no leitor de ELISA (Labsystems Multiskan -MS) a 492nm.

### **2.8.2. Quantificação dos Níveis de IFN- $\gamma$ do Sobrenadante de Cultura de Linfócitos do Sangue Periférico de Pacientes Portadores de E.M. em Surto, Remissão e de Indivíduos Normais:**

O anticorpo monoclonal de rato anti-IFN- $\gamma$  humano purificado (Pharmlingen, CA, USA) foi diluído em PBS estéril na concentração de 2.0  $\mu\text{g/ml}$  e adicionado em placas de 96 poços (Costar, USA) com posterior incubação por 18 horas a 4°C. Após este período foram feitas 2 lavagens com PBS/Tween 20 a 0.05% e adicionado 200 $\mu\text{l}$  de PBS/SBF 10%, para bloquear as reações inespecíficas, as microplacas foram deixadas por 2 horas a temperatura ambiente. Terminado esse período, lavou-se 3 vezes com PBS/Tween 20 a 0.05%. e, em seguida foram adicionados 100 $\mu\text{l}$  do sobrenadante de cultura de linfócitos dos pacientes portadores de E.M. ou de indivíduos normais, obtido como descrito no item 2.6., e do padrão IFN- $\gamma$  recombinante humano (Pharmlingen, CA, USA), nas diferentes concentrações. Novamente, a microplaca foi incubada a 4°C por 18 horas. Passado esse tempo, lavou-se 4 vezes com PBS/Tween 20 a 0.05% e adicionou-se 100 $\mu\text{l}$  do anticorpo monoclonal de rato anti IFN- $\gamma$  humano (Pharmlingen, CA, USA) marcado com biotina, diluído em PBS/10% SBF (Microbiológica, RJ, Brasil) na concentração 2,0  $\mu\text{g/ml}$ . A placa foi incubada por 45 minutos a temperatura ambiente e, em seguida, foram feitas 6 lavagens com PBS/Tween 20 a 0.05% e adicionou-se então 100 $\mu\text{l}$  de avidina- peroxidase (Sigma, USA) diluída a 1:400 em PBS/SBF 10%. Incubou-se a microplaca por 30 minutos a temperatura ambiente. Terminado o período de incubação, lavou-se 8 vezes com PBS/Tween 20 a 0.05% e adicionou-se 100 $\mu\text{l}$  do substrato para peroxidase (OPD, tampão citrato e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), incubando-se por, aproximadamente, 30 minutos. Para bloquear a reação, adicionou-se H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N. As leituras foram realizadas no leitor de ELISA (Labsystems Multiskan -MS) a 492nm.

### **2.8.3. Quantificação dos Níveis de IL- 4 no Sobrenadante de Cultura de Linfócitos do Sangue Periférico de Pacientes Portadores de E.M. em Surto, Remissão e de Indivíduos Normais:**

O anticorpo monoclonal anti-IL-4 humano purificado (Pharmingen, Ca, USA) foi diluído em PBS na concentração de 0,5 µg/ml e adicionado em placas de 96 poços (Nunc-Immuno Plate, GERMANY) com posterior incubação por 18 horas a 4°C. Após este período foram feitas 5 lavagens com PBS/tween 20 a 0,05 % e adicionado 100µl de PBS/BSA 0,1%, para bloquear as reações inespecíficas, as microplacas foram deixadas por 1 hora a temperatura ambiente. Terminado esse período, lavou-se 5 vezes com PBS/Tween 20 a 0.05%. e, em seguida foram adicionados 100µl do sobrenadante de cultura de linfócitos dos pacientes portadores de E.M. ou de indivíduos normais, obtido como descrito no item 2.6., e do padrão IL-4 recombinante humano (Pharmingen, CA, USA) nas diferentes concentrações. A microplaca foi incubada por 2 horas a temperatura ambiente. Passado esse tempo, lavou-se 5 vezes com PBS/Tween 20 a 0.05% e adicionou-se 100µl do anticorpo monoclonal anti IL-4 biotilado (Pharmingen, CA, USA), diluído em PBS/BSA 0,1% na concentração 0,5 µg/ml. A placa foi incubada por 2 horas a temperatura ambiente e, em seguida foram feitas 5 lavagens com PBS/Tween 20 a 0.05% e adicionou-se então, 100µl de HRP-estrepto, diluída a 1:1500 em PBS/BSA 0,1%. Incubou-se a microplaca por 1 hora a temperatura ambiente. Terminado o período de incubação, lavou-se 5 vezes com PBS/Tween 20 a 0.05% e adicionou-se 100µl do substrato para peroxidase (OPD, tampão citrato e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), incubando-se por, aproximadamente, 15 minutos. Para bloquear a reação, adicionou-se H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N. As leituras foram realizadas no leitor de ELISA (Labsystems Multiskan -MS) a 492nm.

#### **2.8.4. Quantificação dos Níveis de IL-10 do Sobrenadante de Cultura de Linfócitos do Sangue Periférico de Pacientes Portadores de E.M. em Surto, Remissão e de Indivíduos Normais:**

O anticorpo monoclonal de rato anti-IL-10 humano purificado (Pharmingen, CA, USA) foi diluído em PBS estéril na concentração de 2.0 µg/ml e adicionado em placas de 96 poços (Costar, USA) com posterior incubação por 18 horas a 4°C. Após este período foram feitas 2 lavagens com PBS/Tween 20 a 0.05% e adicionado então, 200µl de PBS/SBF 10%, para bloquear as reações inespecíficas, as microplacas foram deixadas por 2 horas a temperatura ambiente. Terminado esse período, lavou-se 3 vezes com PBS/Tween 20 a 0.05%. e, em seguida foram adicionados 100µl do sobrenadante de cultura de linfócitos dos pacientes portadores de E.M. ou de indivíduos normais, obtido como descrito no item 2.6., e do padrão IL-10 recombinante humano (Pharmingen, CA, USA), nas diferentes concentrações. Novamente a microplaca foi incubada a 4°C por 18 horas. Passado esse tempo, lavou-se 4 vezes com PBS/Tween 20 a 0.05% e adicionou-se 100µl do anticorpo monoclonal rato anti IL-10 humano (Pharmingen, CA, USA) marcado com biotina, diluído em PBS/10% SBF (Microbiológica, RJ, Brasil) na concentração 1,0 µg/ml. A placa foi incubada por 45 minutos a temperatura ambiente, e, em seguida foram feitas 6 lavagens com PBS/Tween 20 a 0.05% e adicionou-se então 100µl de avidina-peroxidase (Sigma, USA) diluída a 1:400 em PBS/SBF 10%. Incubou-se a microplaca por 30 minutos a temperatura ambiente. Terminado o período de incubação, lavou-se 8 vezes com PBS/Tween 20 a 0.05% e adicionou-se 100µl do substrato para peroxidase (OPD, tampão citrato e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), incubando-se por, aproximadamente, 30 minutos. Para bloquear a reação, adicionou-se H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N. As leituras foram realizadas no leitor de ELISA (Labsystems Multiskan -MS) a 492nm.

### **2.8.5. Quantificação de TGFβ:**

Utilizou-se o método biológico de quantificação de TGFβ, baseado na propriedade do TGFβ inibir o crescimento das células epiteliais (CCL64).

Foram colocados 100 µl de suspensão de células da linhagem CCL64, ressuspensas em meio RPMI completo acrescido de SBF 5%, em placas de cultura de 96 wells (Costar, CA, USA) à concentração de  $2 \times 10^5$  células /ml e a placa foi incubada por 24 horas em estufa com CO<sub>2</sub> 5% , a 37<sup>0</sup> C. Após esse período foram adicionados 100 µl dos sobrenadantes de cultura de linfócitos do sangue periférico de pacientes portadores de E.M. e de indivíduos normais. Colocou-se também 100µl de TGFβ humano natural ultrapuro, em diferentes concentrações, incubando-se por 24 horas em estufa de CO<sub>2</sub> 5% a 37<sup>0</sup>C. Em seguida, as células em cultura foram marcadas com 1 uCi de [<sup>3</sup>H]-Timidina e mantidas por mais 24 horas em estufa de CO<sub>2</sub> 5% a 37<sup>0</sup>C. Terminado esse período, o sobrenadante da cultura foi desprezado e adicionou-se 200 µl de tripsina (1:250), com a finalidade de soltar as células aderentes. A lavagem das células foi realizada no coletor de células (PHD cell-harvester-Cambridge Technology Inc.) e a inibição da proliferação das células CCL64 foi avaliada através do cintilador β (Beckman, USA).

*ANÁLISE ESTATÍSTICA*

Para análise estatística dos dados utilizou-se o teste t Student, ao nível de significância de 5%.

*RESULTADOS*

## **Níveis de TNF $\alpha$ Plasmático de Pacientes Portadores de E.M. em Remissão e de Indivíduos Normais, Produzidos por Células Estimuladas por PHA, MBP e LPS.**

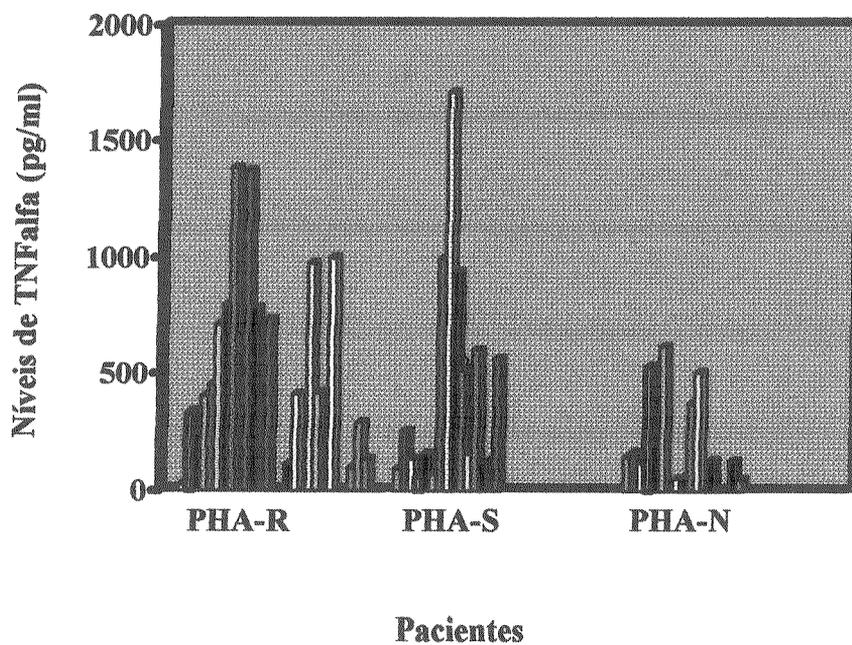
Nas tabelas I, II e III e figura 1 temos os resultados das determinações de TNF  $\alpha$  quando as células de 31 pacientes com a doença em remissão, 13 pacientes em surto e 17 indivíduos normais foram estimuladas por PHA; os dados mostram que a variação entre as determinações é muito grande 0-1388 pg/ml para os pacientes em remissão, 61,0 - 1780,0 pg/ml pacientes em surto e 0 - 618,7 pg/ml para os indivíduos normais; este nível de variação é normalmente observado em estudos clínicos dessa natureza, tendo em vista a variação genética dos indivíduos, tempo e severidade da doença.

Analisando separadamente, é possível verificar que 17 dos 31 pacientes em remissão estudados, apresentaram aumento da produção de TNF  $\alpha$ , em relação ao controle sem estímulo (54%). Com relação ao grupo de pacientes em surto, quando os mesmos tiveram as células do sangue estimulados pelo PHA, houve 100% de aumento da produção de TNF  $\alpha$  quando se comparou com as mesmas células sem estímulo. Com relação ao grupo normal 11 dos 13 indivíduos tiveram aumento da produção de TNF  $\alpha$ , utilizando PHA como estímulo (87%). Do ponto de vista estatístico foi possível verificar que há aumento significativo na produção da TNF  $\alpha$  pelo grupo de pacientes portadores de E.M. em surto ( $p=0,02$ ), quando se comparou com a produção dessa citocina pelo grupo de indivíduos normais.

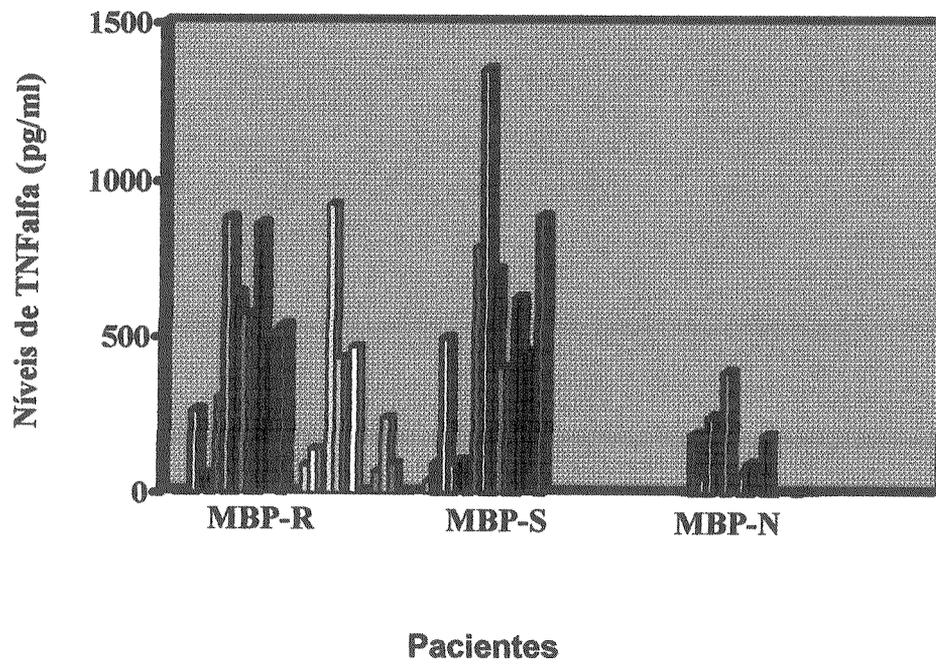
Com relação à produção de TNF  $\alpha$  em resposta ao estímulo “in vitro” com a MBP (figura 2), a variação individual também foi muito grande, sendo de 0 - 862,0 pg/ml para o grupo de pacientes em remissão, 4,8 - 1352,0 pg/ml no grupo de pacientes em surto e 0 - 390,0 pg/ml nos indivíduos normais. Os resultados mostram que 15 dos 31 pacientes em remissão (48%) apresentaram níveis superiores ao grupo que não foi estimulado com o neuroantígeno. Nossos dados também mostram que 11 dos 13 pacientes em surto (84%) apresentaram aumento da produção de TNF  $\alpha$  em resposta ao neuroantígeno. Em relação ao grupo de indivíduos normais, 4 dos 17 (23%) indivíduos

estudados apresentaram níveis de TNF  $\alpha$  superiores aos observados no grupo de células não estimuladas (liberação espontânea) (tabelas I, II e III). Do ponto de vista estatístico, houve aumento da produção de TNF  $\alpha$  tanto no grupo de pacientes em remissão ( $p=0,02$ ) quanto no grupo de pacientes em surto ( $p=0,004$ ) em comparação com o grupo de indivíduos normais.

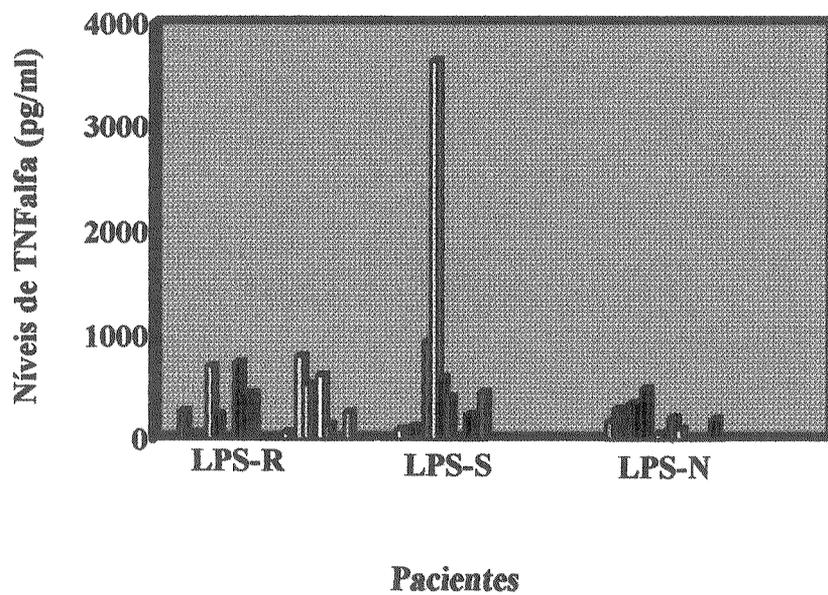
Com relação aos níveis de TNF  $\alpha$  produzidos pelas células estimuladas pelo LPS de *E. coli*, espessos na figura 3, os resultados mostram que houve variação de 0 - 798,0 pg/ml no grupo de pacientes em remissão, 0 - 3633,0 pg/ml no grupo de pacientes com a doença em atividade e 0 - 485,0 pg/ml nos indivíduos normais. O estímulo com LPS foi capaz de aumentar a produção de TNF  $\alpha$  de 10 dos 31 pacientes com E.M. em remissão estudados (32%), 8 dos 13 pacientes em surto (61%) e 6 dos 17 (59%) dos indivíduos normais (tabelas I, II e III). Observamos que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados ( $p > 0,05$ ).



**Figura 1. Níveis de TNF $\alpha$  no plasma de pacientes portadores de Esclerose Múltipla (surto “S” e remissão “R”) e de indivíduos normais “N”, quando as células foram previamente estimuladas por PHA (10 $\mu$ g/ml).**



**Figura 2.** Níveis de TNF $\alpha$  no plasma de pacientes portadores de Esclerose Múltipla (surto “S” e remissão “R”) e de indivíduos normais “N”, quando as células foram previamente estimuladas por MBP (25 $\mu$ g/ml).

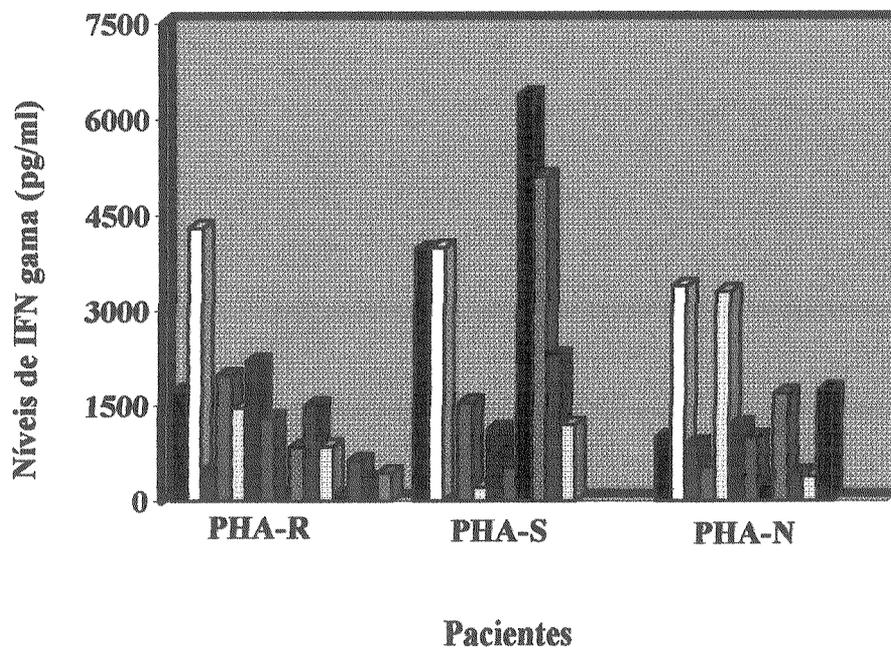


**Figura 3. Níveis de TNF $\alpha$  no plasma de pacientes portadores de Esclerose Múltipla (surto “S” e remissão “R”) e de indivíduos normais “N”, quando as células foram previamente estimuladas por LPS (0,1 $\mu$ g/ml).**

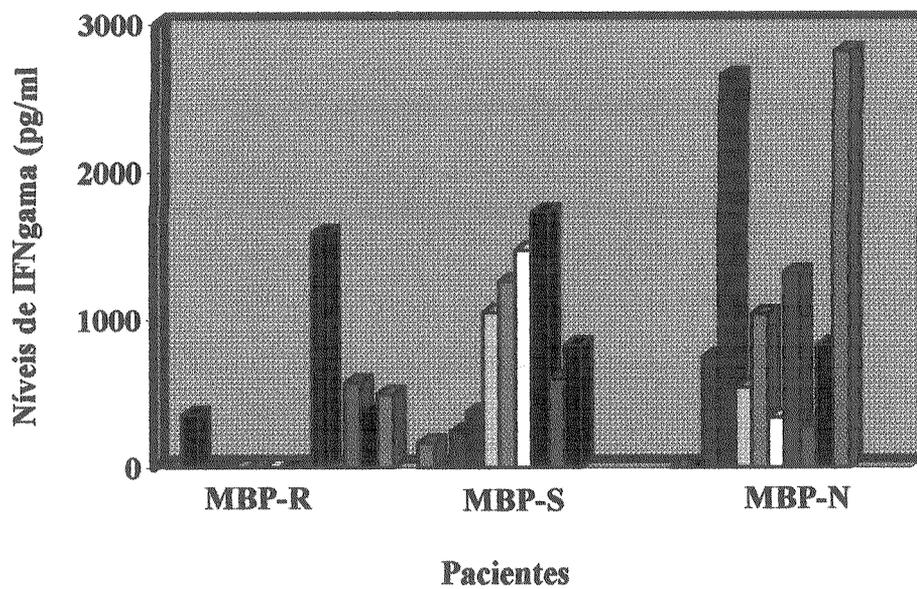
### **Níveis de IFN $\gamma$ Produzidos por Células de Pacientes Portadores de E.M. em Atividade, Remissão e de Indivíduos Normais.**

Foram estudados 15 pacientes com Esclerose Múltipla em remissão, 11 com doença em atividade e 12 indivíduos normais. A variação individual foi de 0 - 2199,0 pg/ml no grupo de pacientes com a doença em remissão, 0 - 3969,0 pg/ml na fase ativa e 531,0 - 3390,0 pg/ml quando as células foram estimuladas com PHA. A PHA é um mitógeno policlonal inespecífico normalmente utilizada como ativadora da produção de IFN  $\gamma$ . Linfócitos de 12 dos 15 pacientes com a doença em remissão (80%) tiveram a produção de IFN  $\gamma$  aumentada pelo estímulo com PHA, 8 dos 11 indivíduos com a doença em atividade (72,7%) tiveram aumento da produção de IFN $\gamma$ . Com relação aos indivíduos normais, as células dos 5 dos 12 pacientes (41,6%) produziram mais IFN  $\gamma$  que as mesmas células sem estímulo (liberação espontânea) (Resultados expressos na figura 4 e tabelas IV, V e VI).

Os resultados apresentados na figura 5 e tabelas IV, V e VI mostram que quando as células dos 3 grupos de indivíduos foram estimuladas pelo neuroantígeno, também a variação individual foi observada, sendo que o grupo de pacientes com E.M. em remissão variou de 0 - 1587,0 pg/ml, 0 - 1730,0 pg/ml no grupo com a doença em atividade e no grupo de indivíduos normais 0 - 2648,0 pg/ml. Dos pacientes em remissão estudados, 3 dos 15 produziram IFN  $\gamma$  quando as células foram ativadas pelo neuroantígeno (20%). Com relação ao grupo de indivíduos normais 2 dos 9 (22,2 %) também produziram IFN  $\gamma$  quando as células foram ativadas pelo neuroantígeno (MBP) e 5 dos 11 (45,5%) pacientes com a doença em atividade também apresentaram produção aumentada de IFN  $\gamma$ . Analisando do ponto de vista estatístico, não houve diferença quanto a produção de IFN  $\gamma$  no grupo de pacientes em remissão ( $p > 0,05$ ) e no grupo de pacientes em surto ( $p > 0,05$ ) quando comparado ao grupo de indivíduos normais.



**Figura 4. Níveis de IFN $\gamma$  no sobrenadante de cultura de linfócitos do sangue periférico de pacientes portadores de Esclerose Múltipla (surto “S” e remissão “R”) e de indivíduos normais “N”, quando as células foram estimuladas por PHA (10 $\mu$ g/ml).**



**Figura 5. Níveis de IFN $\gamma$  no sobrenadante de cultura de linfócitos do sangue periférico de pacientes portadores de Esclerose Múltipla (surto “S” e remissão “R”) e de indivíduos normais “N”, quando as células foram estimuladas por MBP (25 $\mu$ g/ml).**

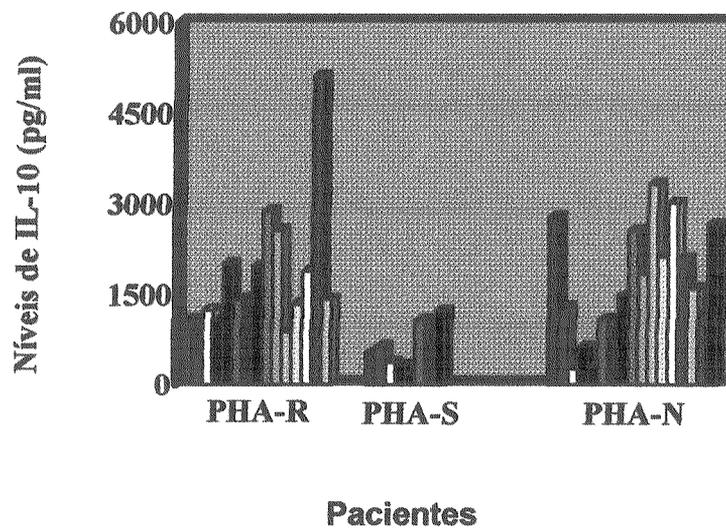
### **Níveis de IL4 no Sobrenadante de Células de Pacientes Portadores de E.M. em Atividade, Remissão e de Indivíduos Normais.**

Foram estudados 17 pacientes com a doença em remissão, 8 em atividade e 11 indivíduos normais. As tabelas VII, VIII e IX mostram que basicamente não houve produção de IL4 pelos pacientes com a doença em atividade ou em remissão. No grupo de pacientes com a doença em remissão, apenas um paciente (LMD) teve níveis detectáveis de IL4. No grupo de indivíduos normais, os valores dessa citocina variaram de 0,74 a 743,0 pg/ml, sendo que 100% tiveram níveis maiores quando as células foram estimuladas com PHA. Apenas 2 indivíduos normais responderam ao estímulo com MBP.

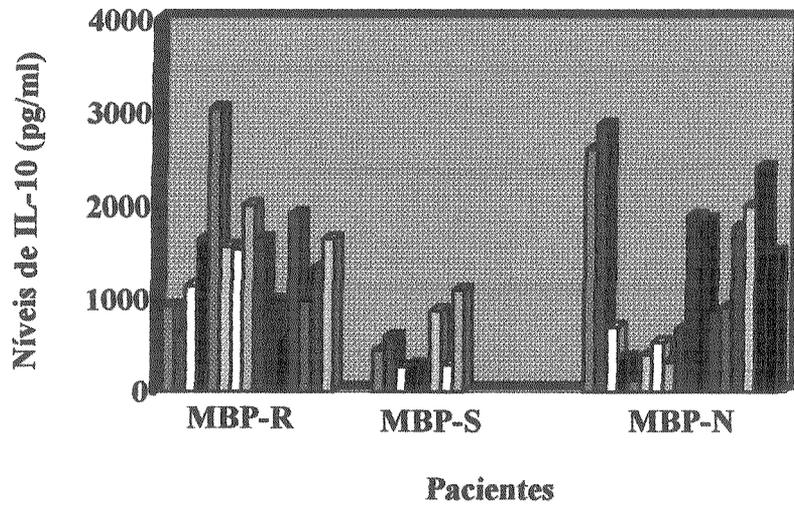
## **Níveis de IL10 no Sobrenadante de Células de Pacientes Portadores de E.M. em Atividade, Remissão e de Indivíduos Normais, Estimulados por PHA e MBP.**

Foram estudados 15 pacientes com doença em remissão, 8 em atividade e 17 indivíduos normais. Resultados apresentados na figura 6 e tabelas X, XI e XII mostram que no grupo de pacientes a variação individual foi de 496,6 - 5123,9 pg/ml, no grupo com a doença em remissão, de 164,5 - 1231,4 nos pacientes em surto e de 266,5 - 3336,1 pg/ml nos indivíduos normais, quando as células foram estimuladas por PHA. No grupo de pacientes com a doença em remissão 86 % responderam ao estímulo com PHA, produzindo IL10, quando se comparou os níveis de IL10 sintetizados pelas células não estimuladas; 75 % dos pacientes com a doença em atividade e 76 % dos indivíduos normais.. Do ponto de vista estatístico, não houve diferença entre o grupo com a doença em remissão e de indivíduos normais ( $p=0,81$ ). O grupo de indivíduos com a doença em atividade, no entanto, produziram níveis de IL10 significativamente menor que os indivíduos normais ( $p=0,005$ ).

Com relação ao neuroantígeno, as determinações variaram de 606,6 - 3045,8 pg/ml no grupo de pacientes com a doença em remissão, 0 - 1100,5 pg/ml com a doença em atividade e 121,8 - 2861,5 pg/ml nos indivíduos normais. Houve aumento da produção de IL10, quando se comparou a liberação espontânea em 80 % dos indivíduos com a doença em remissão, 87 % em atividade e 76 % em nos indivíduos normais. Não houve diferença estatisticamente significativa quando foi analisada a produção de IL10 do grupo de pacientes com a doença em remissão ( $p=0,57$ ). O grupo de pacientes com a doença em atividade produziram menos IL10 quando comparado ao grupo de indivíduos normais ( $p=0,02$ ). (Figura 7 e tabelas X, XI e XII).



**Figura 6. Níveis de IL-10 no sobrenadante de cultura de linfócitos do sangue periférico de pacientes portadores de Esclerose Múltipla (surto “S” e remissão “R”) e de indivíduos normais “N”, quando as células foram previamente estimuladas por PHA (10µg/ml).**



**Figura 7. Níveis de IL-10 no sobrenadante de cultura de linfócitos do sangue periférico de pacientes portadores de Esclerose Múltipla (surto “S” e remissão “R”) e de indivíduos normais “N”, quando as células foram previamente estimuladas por MBP (25µg/ml).**

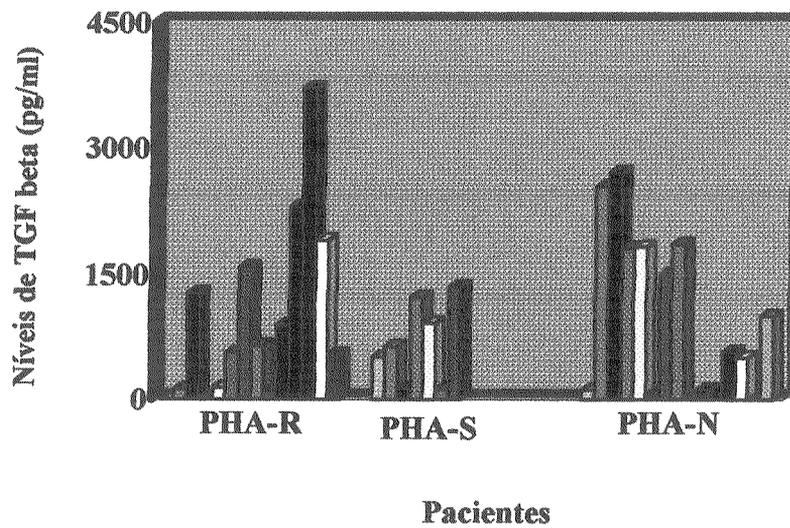
### **Níveis de TGF $\beta$ do Sobrenadante de Células de Pacientes Portadores de E.M. em atividade, remissão e de Indivíduos Normais.**

Foram estudados 15 pacientes com doença em remissão, 7 em atividade e 15 indivíduos normais. A figura 8 e tabelas XIII, XIV e XV mostram que no grupo de pacientes, a variação individual foi de 10,0 - 3710,0 pg/ml no grupo com a doença em remissão, de 128,6 - 1350,0 pg/ml nos pacientes em surto e de 9,91 - 2700,0 pg/ml nos indivíduos normais quando as células foram estimuladas por PHA.

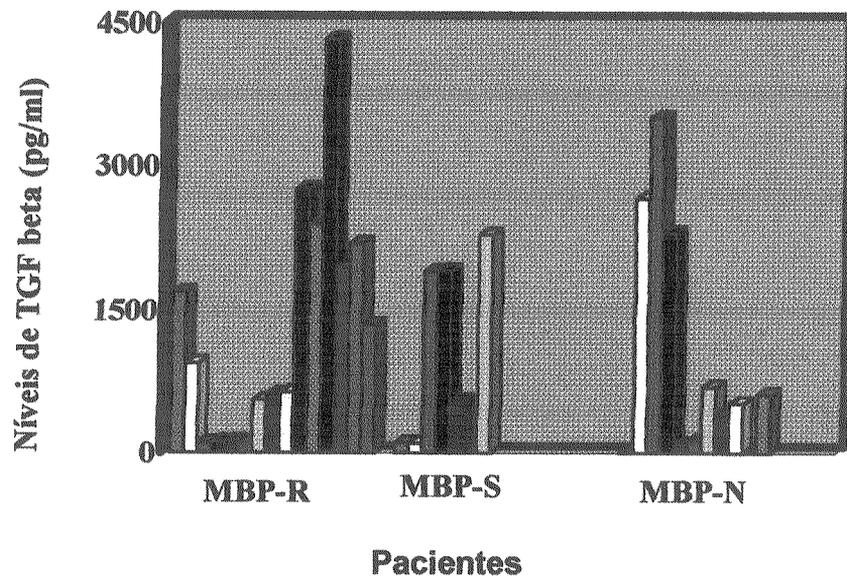
No grupo de pacientes com a doença em remissão 27% responderam ao estímulo do PHA, produzindo TGF $\beta$ , quando se comparou os níveis de TGF $\beta$  sintetizados pelas células não estimuladas; 57% dos pacientes com a doença em atividade e 7% dos indivíduos normais. Do ponto de vista estatístico, não houve diferença entre o grupo com a doença em remissão e de indivíduos normais ( $p=0,88$ ). Embora o grupo de indivíduos com a doença em atividade tenham produzido níveis de TGF $\beta$  significativamente menor que em indivíduos normais, estes valores não atingiram significância estatística ( $p > 0,05$ ).

Com relação ao neuroantígeno, as determinações variaram de 103,9 - 4330,0 pg/ml no grupo de pacientes em remissão, de 12,1 - 2290,0 pg/ml com a doença em atividade e de 9,13 - 3500,0 pg/ml nos indivíduos normais. No grupo de pacientes em remissão, quando as células foram estimuladas pelo neuroantígeno observamos que 47% apresentaram níveis de TGF  $\beta$  aumentados, 57% dos pacientes em surto e 20% dos indivíduos normais tiveram seus níveis de TGF  $\beta$  também aumentados. Em termos estatísticos esses valores não foram significativos ( $P > 0,05$ ) (Figura 9 e tabelas XIII, XIV e XV).

\*



**Figura 8. Níveis de TGF $\beta$  no sobrenadante de cultura de linfócitos do sangue periférico de pacientes portadores de Esclerose Múltipla (surto “S” e remissão “R”) e de indivíduos normais “N”, quando as células foram previamente estimuladas por PHA (10 $\mu$ g/ml).**



**Figura 9. Níveis de TGFβ no sobrenadante de cultura de linfócitos do sangue periférico de pacientes portadores de Esclerose Múltipla (surto “S” e remissão “R”) e de indivíduos normais “N”, quando as células foram previamente estimuladas por MBP (25μg/ml).**

*DISCUSSÃO*

O presente estudo visou quantificar as citocinas com efeito pró-inflamatório (TNF  $\alpha$  e IFN  $\gamma$ ) e anti-inflamatório (IL4, IL10 e TGF  $\beta$ ) produzidas por células do sangue periférico de pacientes portadores de E.M. A E.M. é uma doença inflamatória, de caráter autoimune, compartimentalizada no SNC. No entanto, essa doença pode ser considerada sistêmica, diante de inúmeras alterações imunológicas observadas também no sangue periférico (HAFLER & WEINER, 1989). Isto justifica plenamente nosso trabalho, que foi desenvolvido utilizando-se células do sangue periférico. O objetivo principal foi verificar se a determinação dos níveis de citocinas com efeito pró e anti-inflamatório se correlacionava com a atividade da doença. Não foi nossa preocupação, nesse trabalho, estudar a população celular responsável pela síntese destas citocinas.

Estudos desenvolvidos no modelo experimental autoimune (E.A.E.), mostraram que as citocinas produzidas pela subpopulação de linfócitos Th1 estão envolvidas na patogênese da doença. O aumento da produção de TNF  $\alpha$  e IFN  $\gamma$  está descrito tanto nas regiões de lesões da E.M., como no líquido céfalo-raquidiano e por células do sangue periférico de pacientes portadores de E.M., principalmente na fase ativa da doença. O TNF  $\alpha$  potencializa as reações inflamatórias na E.M., pois age ativamente no recrutamento de macrófagos para o local da lesão e estes promovem a destruição tecidual; o TNF  $\alpha$  pode aumentar a expressão de moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1 sobre as células endoteliais que facilitam a passagem das células inflamatórias rompendo, dessa forma, a barreira hemato-encefálica.

Nossos dados confirmaram a importante participação do TNF  $\alpha$  na E.M. A variação individual entre as determinações dos níveis de TNF  $\alpha$  estudados foi grande. Esta variação é aceitável em estudos clínicos dessa natureza, uma vez que não temos uniformidade entre os diferentes indivíduos estudados. Os pacientes são diferentes quanto à bagagem genética, gravidade e tempo da doença e a utilização ou não de medicamentos. Ponderando as variações observadas, foi possível verificar que 54% dos pacientes em remissão e 84% dos pacientes com a doença em atividade apresentaram aumento da produção de TNF  $\alpha$ , quando as células foram estimuladas com PHA, atingindo valores significativos para o grupo de pacientes em surto ( $p=0,02$ ). Quando as células foram estimuladas pelo neuroantígeno (MBP), verificou-se que 48% dos pacientes em remissão

84% dos pacientes em surto apresentaram aumento na produção de TNF  $\alpha$  quando comparado ao grupo de indivíduos normais, sendo que esses índices atingiram níveis significativos, tanto para o grupo de pacientes em surto como nos pacientes na fase de remissão da doença ( $p=0,02$  e  $p=0,004$ ), respectivamente. Não foi observado aumento estatisticamente significativo entre os três grupos quando a produção de TNF  $\alpha$  foi ativada com LPS de *E. coli* um potente ativador dessa citocina ( $p > 0,05$ ).

Nossos dados, de uma forma geral, estão em concordância com vários autores, que previamente mostraram que o TNF  $\alpha$ , pela ação mielino-tóxica, exerce importante papel no desenvolvimento da E.M. Muito interessante foi a observação que células ativadas pelo neuroantígeno, induzem ativação da produção de TNF  $\alpha$  tanto no grupo de pacientes com a doença em atividade, como em menor proporção, no grupo de pacientes em remissão.

Estes dados estão em concordância com BROD et al., (1995) e CORREALE et al. (1995) que também verificaram aumento dos níveis de TNF  $\alpha$  por células específicas para antígenos componentes de mielina, tanto MBP como PLP. Embora os níveis de TNF  $\alpha$  estejam aparentemente elevados no grupo de pacientes com a doença em atividade, o fato de verificarmos que os pacientes em remissão também apresentam aumento dessa citocina quando estimulados pelo neuroantígeno, pode ser explicado pela presença de células auto-reativas circulantes, específicas para MBP (OTA et al., 1990). Nosso trabalho é relevante na medida em que dá início ao estudo da resposta imunológica em pacientes com a doença no SNC. No entanto, fica a crítica das determinações de apenas um ponto, ou seja, uma única determinação, sendo que o ideal seria o estudo longitudinal. A dificuldade principal nesse tipo de estudo é a grande variação clínica observada de paciente para paciente. Com a introdução de métodos de diagnóstico como a ressonância nuclear magnética, foi possível verificar que mesmo na ausência dos sintomas clínicos, os processos de desmielinização estão presentes em pacientes com E.M.. Por outro lado, muitos pacientes levam anos sem ter a exacerbação clínica, o que dificulta muito o seguimento longitudinal, em termos de avaliação imunológica.

O IFN  $\gamma$  é tido como uma citocina pró-inflamatória, pois modula a expressão de antígenos MHC de classe II na superfície de células apresentadoras de antígenos. As

células do SNC normalmente não expressam moléculas do MHC. Na presença de IFN  $\gamma$ , no entanto, astrócitos, micróglia e células endoteliais passam a expressar a molécula de classe II e a apresentar neuroantígenos. (McCARNON et al., 1986) ou a ativar a função dos linfócitos T citotóxicos.

O IFN  $\gamma$  ativa os macrófagos que são os efetores dos mecanismos de desmielinização (PRINEAS & GRAHAN, 1981), através da liberação de proteínases que degradam as proteínas componentes da mielina. O IFN  $\gamma$  também induz a expressão de moléculas de adesão que regulam a migração de linfócitos para os sítios de inflamação, facilitando a entrada destas células inflamatórias no SNC.

Em nosso estudo, não foi possível verificar diferença significativa entre os níveis de IFN  $\gamma$  produzidos por células de pacientes portadores de E.M. em atividade, em remissão e do grupo de indivíduos normais. Embora existam várias evidências da atuação do IFN  $\gamma$  ao nível do sangue periférico, essa maior produção não pode ser verificada. É possível que o método de ELISA empregado não tenha sensibilidade suficiente para determinar os níveis de IFN  $\gamma$ . Nesse tipo de estudo, muitas vezes é preferível o emprego de SPOT-ELISA, que quantifica a produção de citocinas ao nível de uma única célula, como já foi descrito por OLSSON et al., (1993).

Embora vários pesquisadores tenham demonstrado aumento de IFN  $\gamma$  no SNC e sangue periférico, nossos dados estão de acordo com outros autores que também não observaram a alteração dos níveis de IFN  $\gamma$  nos pacientes portadores de E.M. em atividade (MUSSETTE et al., 1996).

A questão se o IFN  $\gamma$  é importante para a indução da E.A.E. também foi feita utilizando-se animais que tiveram desativados os genes responsáveis pela síntese desta citocina, sendo verificado que mesmo na ausência do IFN  $\gamma$ , os animais faziam E.A.E com a mesma gravidade e incidência (FERBER et al., 1996). Esses dados mostram que o IFN $\gamma$  tem importância na manutenção da inflamação, mas não na indução da E.A.E..

Vários estudos demonstraram que na completa ausência de IL4, ou em presença de relativamente grande quantidade dessa citocina, as células T desenvolvem fenótipo Th1 e Th2, respectivamente (LIBLAU et al., 1995). No modelo da E.A.E, linfócitos CD4 Th1, quando adotivamente transferidos, causam a doença. No entanto, quando IL4 foi

administrada juntamente com células encefalitogênicas, a doença foi suprimida e células Th2 puderam ser isoladas do baço dos animais recipientes (RACKE et al., 1994).

Estes achados mostraram a importante participação da IL4 na imunorregulação das doenças inflamatórias autoimunes do SNC. Quantificando IL4 de células do sangue periférico de pacientes com E.M, no entanto, não fomos capazes de encontrar níveis detectáveis dessa citocina, tanto nos pacientes em remissão, como naqueles que apresentaram a doença em atividade.

Tanto a IL4, como outras citocinas produzidas por linfócitos Th2, como a IL10 têm a função de antagonizar os efeitos das citocinas produzidas por linfócitos do tipo Th2. Em nosso estudo, demonstramos que os níveis de IL10 estavam significativamente diminuídos no grupo de pacientes que apresentavam a doença em atividade. Estes dados estão em concordância com outros autores que também observaram a presença de IL10 no tecido cerebral de pacientes com a doença em remissão, ao passo que essa citocina não foi observada na fase de atividade da doença (RIECKMANN et al., 1994).

Uma série de abordagens imunoterapêuticas tem sido empregadas tanto no modelo experimental como em pacientes, com o objetivo de se reduzir os danos das doenças autoimunes. Alguns autores verificaram que a administração oral de MBP reduzia a severidade da E.A.E. através da ativação de células com função supressora (LIDER et al., 1989). Estudos posteriores mostraram que a redução da severidade da E.A.E. pela indução da tolerância oral a MBP estava associada ao aumento da produção de TGF $\beta$  (MILLER et al., 1991; MILLER et al., 1993). Recentemente, utilizando-se esse mesmo modelo experimental, os autores descreveram uma terceira subpopulação de linfócitos, Th3, que seriam as células que preferencialmente produzem TGF $\beta$  (CHEN et al., 1995). Foi demonstrado também, que a transferência adotiva deste tipo de células a animais recipientes, protegiam contra a indução de E.A.E. (CHEN et al., 1995). Na Esclerose Múltipla, MOKHTARIAN et al. (1994) demonstraram a redução da síntese de TGF $\beta$  em células do sangue periférico de pacientes com a doença em atividade. Nossos dados mostram que há uma visível diminuição da produção de TGF $\beta$  pelas células dos pacientes com E.M em atividade, quando se comparou com a produção dos pacientes com a doença em remissão e de indivíduos normais, esses valores, no entanto, não atingiram níveis

estatisticamente significativos provavelmente, devido ao número muito pequeno de casos estudados.

Nosso estudo mostra que a exacerbação da E.M pode ser resultado do desequilíbrio da produção de algumas citocinas com efeito pró e anti-inflamatório. Os fatores que influenciam a polarização dos diferentes fenótipos, no entanto, não estão bem conhecidos. Citocinas presentes no microambiente de diferenciação dos linfócitos influenciam na maturação de um ou outro subtipo de linfócito. A IL-4 e IL-12 são as citocinas envolvidas nesse processo que foram melhor estudadas. A IL12 está envolvida na diferenciação dos clones Th1 produtores de IFN  $\gamma$  (KAPLAN et al., 1996) enquanto IL4 presente no microambiente orienta a diferenciação de clones Th2 (NICHOLSON & KUCHROO, 1996).

As moléculas co-estimulatórias exercem um papel central na ativação das células T e recentemente uma série de evidências têm associado a maior ou menor expressão dessas moléculas com a produção de determinados padrões de citocinas. Recentemente, os autores mostraram que a administração de anticorpos anti-B7.1 simultaneamente com a imunização de camundongos com PLP 139-151 reduzia a severidade da E.A.E., enquanto que os anticorpos anti-B7.2 não inibiram a indução de clones específicos para PLP, mas alteraram o padrão do clone, produzindo predominantemente células Th2. A transferência adotiva desses clones previnía e revertia a E.A.E. Este estudo, portanto, sugere que os anticorpos anti-B7.1 bloqueiam a ativação dos clones Th1 e, conseqüentemente inibem a progressão da E.A.E. (KUCHROO et al., 1995). Trabalhando com a molécula co-estimulatória expressa nos linfócitos T (CTLA-4), os autores mostraram que o anticorpo anti-CTLA-4 administrado antes do aparecimento da E.A.E. reduzia a incidência, severidade e duração da doença. A análise histológica do cérebro de animais tratados com o anticorpo, mostrou que o tratamento com anti-CTLA-4 inibia os clones Th1 e aumentavam a produção de citocinas pelos clones Th2, sugerindo que a ligação com CTLA-4 Ig leva à proteção para E.A.E. (KHOURY et al., 1995).

Nosso trabalho é relevante na medida em que chama a atenção para o comprometimento imunológico de doenças autoimunes do sistema nervoso central, que são pouco estudadas no nosso meio. Embora a E.M. seja prevalente no hemisfério norte,

recentes relatos da Associação Brasileira de Esclerose Múltipla, mostraram que o número de casos novos registrados em São Paulo está sendo preocupante. Não temos a informação, no entanto, se a doença está realmente aumentando no nosso meio, ou se devido à maior atenção que a mesma vem recebendo, o diagnóstico está sendo mais acurado. O presente estudo também visou uma maior integração entre as cadeiras básicas e a clínica e, acreditamos que no final, os pacientes serão beneficiados.

*CONCLUSÕES*

1. Pacientes portadores de E.M. apresentaram aumento da produção de TNF  $\alpha$ , quando as células do sangue periférico foram estimuladas por PHA e proteína básica de mielina (MBP).
2. Os níveis de IFN  $\gamma$  não diferiram no grupo de pacientes com a doença em remissão e do grupo de indivíduos normais.
3. Não se detectou níveis de IL4 tanto no grupo de pacientes com E.M. em atividade como no grupo de pacientes com a doença em remissão.
4. Os níveis de IL10 estavam significativamente diminuídos no grupo de pacientes com E.M. em atividade, tanto quando as células foram estimuladas por PHA como pela MBP.
5. Não houve diferença significativa na produção de TGF  $\beta$  no grupo de pacientes com E.M. em remissão. O grupo de pacientes com a doença em atividade apresentou níveis reduzidos da citocina, embora não tenha atingido valores estatisticamente significativos.

*APÉNDICE*

**Quadro I. Dados dos Pacientes Portadores de Esclerose Múltipla.**

PACIENTES	DATA DA COLETA	IDADE	SEXO	DIAGNÓSTICO
A.L.S.	26.09.95	24	M	DEFINITIVO
M.L.C.	24.09.95	25		
	27.05.96	26	F	DEFINITIVO
E.P.M.L.	24.09.95	36		
	25.03.96	37	F	DEFINITIVO
	22.05.96			
J.C.B.	31.10.95	35	M	DEFINITIVO
E.M.O.M.	11.12.95	45	F	DEFINITIVO
M.M.G.V.	31.10.95	34	F	DEFINITIVO
M.D.C.G.F.	20.03.96			
	05.06.96	50	F	DEFINITIVO
S.T.	20.03.96			
H.C.T.	20.03.96			
	13.03.96	25	F	DEFINITIVO
	24.04.96			
	26.06.96			
C.C.	20.03.96			
Ca	20.03.96	12	F	H.D.
M.A.C.	06.03.96			
	26.06.96	31	F	DEFINITIVO
F.P.S.	06.03.96	46	F	DEFINITIVO
MTM.	06.03.96	44	F	DEFINITIVO
R.M.B.	06.05.96	36	M	DEFINITIVO
A.M.F.	27.02.96	52		
	15.04.96	53	F	DEFINITIVO
	10.06.96			
C.M.G.	06.03.96	45	F	DEFINITIVO
D.G.I.	29.05.96	23	F	DEFINITIVO
J.P.S.	29.05.96	44	M	DEFINITIVO
F.D.G.P.	27.05.96			
	06.05.96	37	F	DEFINITIVO
	26.08.96			
L.M.D.	27.05.96	47	F	DEFINITIVO
S.F.P.S.	04.03.96	34	F	DEFINITIVO
N.N.A.O.	04.03.96	35	M	DEFINITIVO
E.D.S.	29.04.96	26	M	DEFINITIVO
A.G.G.	08.05.96	55	F	DEFINITIVO
T.T.N.	24.04.96	29	M	DEFINITIVO
J.B.S.	29.05.96	39	M	DEFINITIVO
M.R.	20.03.96			
	08.05.96	25	F	DEFINITIVO
M.R.C.M.	06.05.96	36	F	DEFINITIVO
M.A.M.R.	06.05.06	49	F	DEFINITIVO
F	20.06.96	30	F	DEFINITIVO
L.P.	19.08.96	35	F	DEFINITIVO
C. A. S.	17.06.96	38	M	DEFINITIVO
A. L. S.	17.06.96	27	M	DEFINITIVO
M.M.	19.06.96	35	F	DEFINITIVO
C.V.	19.06.96	48	M	DEFINITIVO
N.C.B.	11.11.96	40	M	DEFINITIVO
C.R.B.	06.05.96			
	13.05.96	27	F	DEFINITIVO
I.M.L.	26.06.96	28	F	DEFINITIVO

H.D. = HIPÓTESE DIAGNÓSTICA

**Quadro II. Quadro Clínico dos Pacientes Portadores de Esclerose Múltipla.**

PACIENTES	DATA	QUADRO CLÍNICO	TRATAMENTO
A.L.S.	26.09.95	REMISSÃO	CORTICOSTERÓIDES
M.L.C.	24.09.95	SURTO REMISSÃO	CORTICOSTERÓIDES S/MEDICAMENTO
E.P.M.L.	24.09.95 25.03.95 22.05.96	SURTO REMISSÃO REMISSÃO	CORTICOSTERÓIDES S/MEDICAMENTO S/MEDICAMENTO
J.C.B.	31.10.95	SURTO	CORTICOSTERÓIDES
E.M.O.M.	11.12.95	SURTO	CORTICOSTERÓIDES
M.M.G.V.	31.10.95	SURTO	CORTICOSTERÓIDES
M.D.C.G.F.	20.03.96 05.06.96	REMISSÃO SURTO	CORTICOSTERÓIDES S/MEDICAMENTO
S.T.	20.03.96	REMISSÃO	BACOFLEN
H.C.T.	13.03.96 20.03.96 24.04.96 26.06.96	SURTO REMISSÃO REMISSÃO REMISSÃO	IFN $\beta$ IFN $\beta$ CORTICOSTERÓIDES FRONE
C.C.	20.03.96	REMISSÃO	CORTICOSTERÓIDES
Ca	20.03.96	REMISSÃO	PRÉ IFN $\beta$
M.A.C.	06.03.96 26.06.96	REMISSÃO REMISSÃO	NÃO TRATADO S/MEDICAMENTO
F.P.S.	06.03.96	SURTO	NÃO TRATADO
M.T.M.	06.03.96	REMISSÃO	NÃO TRATADO
R.M.B.	06.05.96	REMISSÃO	BACOFLEN
A.M.F.	27.02.96 15.04.95 10.06.96	SURTO REMISSÃO REMISSÃO	NÃO TRATADO S/MEDICAMENTO S/MEDICAMENTO
C.M.G.	06.03.96	REMISSÃO	S/MEDICAMENTO
D.G.I.	29.05.96	SURTO	METICORTEN
J.P.S.	29.05.96	REMISSÃO	S/MEDICAMENTO
F.D.G.P.	06.05.96 27.05.96 26.08.96	REMISSÃO SURTO REMISSÃO	S/MEDICAMENTO S/MEDICAMENTO S/MEDICAMENTO
L.M.D.	27.05.96	REMISSÃO	S/MEDICAMENTO
S.F.P.S.	04.03.96	REMISSÃO	S/MEDICAMENTO
N.N.A.O.	04.03.96	PSEUDO SURTO	S/MEDICAMENTO
E.D.S.	29.04.96	REMISSÃO	S/MEDICAMENTO
A.G.G.	08.05.96	REMISSÃO	S/MEDICAMENTO
T.T.N.	24.04.96	SURTO	S/MEDICAMENTO
J.B.S.	29.05.96	SURTO	S/MEDICAMENTO
M.R.	20.03.96 08.05.96	REMISSÃO REMISSÃO	PRÉ IFN $\beta$ S/MEDICAMENTO
M.R.C.M	06.05.96	REMISSÃO	TRYPTANOL
M.A.M.R.	06.05.96	REMISSÃO	S/MEDICAMENTO
F	20.06.96	REMISSÃO	S/MEDICAMENTO
L.P.	19.08.96	REMISSÃO	S/MEDICAMENTO
C. A . S.	17.06.96	REMISSÃO/PSEUDO SURTO	S/MEDICAMENTO
A.L.S.	17.06.96	REMISSÃO	S/MEDICAMENTO
M.M.	19.06.96	REMISSÃO	S/MEDICAMENTO
C.V.	19.06.96	REMISSÃO	S/MEDICAMENTO
N.C.B.	11.11.96	REMISSÃO	S/MEDICAMENTO
C.R.B.	06.05.96 13.05.96	REMISSÃO REMISSÃO	S/MEDICAMENTO S/MEDICAMENTO
I.M.L.	26.06.96	SURTO	S/MEDICAMENTO

**Tabela I. Níveis de TNF $\alpha$  (pg/ml) no Plasma de Pacientes Portadores de Esclerose Múltipla em Remissão.**

PACIENTES	PHA(10 $\mu$ g/ml)	MBP(25 $\mu$ g/ml)	LPS(0.1 $\mu$ g/ml)	sem estímulo
A.L.S. (26.9.95)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
M.D.C.G.F.(20.03.96)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
S.T. (20.03.96)	26.5	N.D.	N.D.	28.0
C.C. (20.03.96)	329.3	262.0	264.4	202.1
Ca (20.03.96)	238.0	57.7	49.9	N.D.
M.A.C. (06.03.96)	403.3	N.D.	50.7	N.D.
M.T.M.(06.03.96)	449.1	302.3	3.8	3.8
C.M.G. (06.03.96)	712.6	882.3	699.4	393.7
J.P.S. (29.05.96)	795.6	641.6	232.5	56.8
E.P.M.L.(20.03.96)	1383.8	571.8	N.D.	N.D.
E.P.M.L. (20.05.96)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
L.M.D. (27.05.96)	1372.0	863.0	736.1	745.1
M.L.C. (27.05.96)	786.0	483.9	437.0	610.3
N.N.A.O. (04.03.96)	393.7	511.7	438.3	518.9
E.D.S. (29.04.96)	733.1	535.7	N.D.	N.D.
A.M.F. (10.06.96)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
A.G.G. (08.05.96)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
M.R. (20.03.96)	113.0	86.5	7.3	N.D.
C.R.B. (13.05.96)	410.6	137.9	61.6	N.D.
A.M.F. (15.04.96)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
M.R. (08.05.96)	974.9	925.6	798.0	770.4
M.A.M.R. (06.05.96)	415.4	432.2	528.5	530.9
C.R.B. (20.03.96)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
F.D.G.P.(06.05.96)	997.8	468.3	615.1	494.8
C.A.S (17.06.96)	2.2	8.2	134.8	39.5
A.L.S. (17.06.96)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
M.M. (19.06.96)	95.0	66.0	26.0	31.0
C.V. (19.06.96)	289.0	238.5	254.0	188.0
F. (20.06.96)	133.0	91.5	24.0	31.0
M.R.M.C. (17.06.96)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
H.C.T. (13.03.96)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

N.D. = NÃO DETECTÁVEL

**Tabela II. Níveis de TNF $\alpha$  (pg/ml) no Plasma de Pacientes Portadores de Esclerose Múltipla em Surto.**

PACIENTES	PHA(10 $\mu$ g/ml)	MBP(25 $\mu$ g/ml)	LPS(0.1 $\mu$ g/ml)	SEM ESTÍMULO
M.L.C. (24.09.95)	92.9	37.5	N.D.	32.7
E.P.M.L.(24.09.95)	254.1	92.9	N.D.	61.6
J.C.B. (31.10.95)	136.2	497.2	90.5	N.D.
M.M.G.V.(31.10.95)	61.6	92.9	64.0	49.6
E.M.O.M.(11.12.96)	160.3	104.9	121.8	56.8
H.C.T. (20.03.96)	70.0	4.8	N.D.	45.7
F.P.S. (06.03.96)	995.2	788.5	944.7	658.7
A.M.F. (27.02.96)	1708.9	1352.0	3633.0	962.9
D.G.I. (29.05.96)	940.0	716.2	593.5	385.3
F.D.G.P.(27.05.96)	524.9	403.4	400.9	355.2
S.F.P.S. (04.03.96)	155.5	N.D.	N.D.	N.D.
T.T.N. (24.04.96)	603.1	627.1	N.D.	N.D.
I.M.L. (26.06.96)	118.0	456.0	231.5	35.0
J.B.S. (29.05.96)	127.8	70.0	206.0	N.D.
M.D.C.G.F.(05.06.96)	564.6	888.3	449.1	441.9

N.D. = NÃO DETECTÁVEL

**Tabela III. Níveis de TNF $\alpha$  (pg/ml) no Plasma de Indivíduos Normais.**

INDIVÍDU OS	PHA(10ug/ml)	MIBP(25ug/ml)	LPS(0.1ug/ml)	sem estímulo
1	144.6	N.D.	167.5	70.0
2	165.5	187.9	286.6	227.7
3	119.4	49.6	14.7	26.7
4	530.9	243.3	342.3	315.5
5	192.8	68.8	353.1	287.8
6	618.7	390.1	485.4	458.7
7	N.D.	12.3	N.D.	14.7
8	54.4	61.6	49.6	N.D.
9	61.6	92.9	64.0	49.6
10	370.9	N.D.	203.7	168.7
11	506.8	184.3	97.6	35.1
12	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
13	131.4	N.D.	N.D.	N.D.
14	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
15	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
16	129.0	N.D.	192.3	113.0
17	49.9	N.D.	N.D.	N.D.

N.D. = NÃO DETECTÁVEL

**Tabela IV. Níveis de IFN- $\gamma$  (pg/ml) no Sobrenadante de Cultura de Linfócitos do Sngue Periférico de Pacientes Portadores de Esclerose Múltipla em Remissão.**

PACIENTES	PHA(10ug/ml)	MBP(25ug/ml)	sem estímulo
<b>N.C.B. (11.11.96)</b>	1730,0	N.D	N.D.
<b>C.R.B. (20.03.96)</b>	4300,0	358,1	N.D.
<b>A.M.F. (15.04.96)</b>	472,7	N.D.	N.D.
<b>R.M.B. (06.05.96)</b>	1962,0	N.R.	N.D.
<b>F.D.G.P. (02.09.96)</b>	1453,6	N.D.	N.D.
<b>F.D.G.P. (02.06.96)</b>	2199,6	N.D.	N.D.
<b>M.A.C. (26.06.96)</b>	1295,8	N.D.	N.D.
<b>C.R.B. (13.05.96)</b>	N.D.	N.D.	N.D.
<b>F.D.G.P. (27.05.96)</b>	841,0	N.D.	N.D.
<b>H.C.T. (26.06.96)</b>	1496,8	N.D.	N.D.
<b>L.M.D. (27.05.96)</b>	852,3	1587,0	476,5
<b>E.P.M.L. (25.03.96)</b>	95,1	N.D.	N.D.
<b>L.P. (10.08.96)</b>	628,7	574,2	N.R.
<b>M.A.M.R.(06.05.96)</b>	346,9	382,6	602,4
<b>C.R.B. (13.05.96)</b>	437,0	497,2	820,4

N.D.= Não Detectável

**Tabela V. Níveis de IFN- $\gamma$  (pg/ml) no Sobrenadante de Cultura de Linfócitos do Sangue Periférico de Pacientes Portadores de Esclerose Múltipla em Surto.**

PACIENTES	PHA (10 ug/ml)	MBP (25ug/ml)	sem estímulo
<b>S.F.P.S. (04.03.96)</b>	3969,0	166,5	N.R.
<b>N.N.A.O. (04.03.96)</b>	3996,0	N.R.	83,8
<b>T.T.N. (24.04.96)</b>	N.D.	N.D.	N.R.
<b>E.P.M.L. (25.03.96)</b>	1540,0	242,9	711,4
<b>J.P.S. (29.05.96)</b>	210,0	380,0	540,0
<b>J.B.S. (29.05.96)</b>	1120,0	1050,0	1040,0
<b>D.G.I. (29.05.96)</b>	520,0	1260,0	1380,0
<b>I.M.L. (22.06.96)</b>	6390,0	1470,0	980,0
<b>F.D.G.P. (26.08.96)</b>	5100,0	1730,0	1180,0
<b>H.M. (26.06.96)</b>	2290,0	600,0	1080,0
<b>H.C.T. (13.03.96)</b>	1190,0	830,0	540,0

N.D.= Não Detectável

N.R.=Não realizado

**Tabela VI. Níveis de IFN  $\gamma$  (pg/ml) no Sobrenadante de Cultura de Linfócitos de Indivíduos Normais**

Indivíduos	PHA (10 $\mu$ g/ml)	MBP (25 $\mu$ g/ml)	sem estímulo
1	1004,0	N.R.	256,7
2	3390,0	N.D.	N.D.
3	888,0	N.D.	23,7
4	531,0	749,0	918,0
5	3306,0	2648,0	1718,0
6	1183,0	546,0	566,0
7	993,2	1038,0	110,1
8	253,3	339,3	294,2
9	1681,0	1320,0	1320,0
10	440,0	280,0	630,0
11	380,0	830,0	660,0
12	1740,0	2810,0	1070,0

N.D.= Não Detectável

**Tabela VII. Níveis de IL-4 (pg/ml) no Sobrenadante de Cultura de Linfócitos de Pacientes Portadores de Esclerose Múltipla em Remissão.**

Pacientes	PHA(10ug/ml)	MBP(25ug/ml)	sem estímulo
M.A.C. (06.03.96)	N.D.	N.D.	N.D.
N.C.B. (11.11.96)	N.D.	N.D.	N.D.
M.R. (20.03.96)	N.D.	N.D.	N.D.
M.T.M. (20.03.96)	N.D.	N.D.	N.D.
A.M.F. (10.06.96)	N.D.	N.D.	N.D.
E.P.M.L. (27.03.96)	N.D.	N.D.	N.D.
M.R. (08.05.96)	N.D.	N.D.	N.D.
F.P.S. (06.03.96)	N.D.	N.D.	N.D.
A.M.F. (15.04.96)	N.D.	N.D.	N.D.
C.R.B. (13.05.96)	N.D.	N.D.	N.D.
L.M.D. (27.05.96)	975,3	N.D.	N.D.
I.M.L. (26.06.96)	N.D.	N.D.	N.D.
H.C.T. (26.06.96)	N.D.	N.D.	N.D.
F.D.G.P. (26.08.96)	N.D.	N.D.	N.D.
L.P. (19.08.96)	N.D.	N.D.	N.D.
M.A.M.R. (06.05.96)	N.D.	N.D.	N.D.
H.C.T. (24.04.96)	N.D.	N.D.	N.D.

N.D.= Não detectável

**TabelaVIII. Níveis de IL-4 (pg/ml) no Sobrenadante de Cultura de Linfócitos de Pacientes Portadores de Esclerose Múltipla em Surto.**

Pacientes	PHA (10ug/ml)	MBP (25ug/ml)	sem estímulo
S.F.P.S. (04.03.96)	N.D.	N.R.	N.D.
T.T.N. (24.04.96)	N.D.	N.D.	N.D.
F.D.G.P. (27.05.96)	N.D.	N.D.	N.D.
I.M.L. (26.06.96)	N.D.	N.D.	N.D.
N.N.A.O. (04.03.96)	N.D.	N.D.	N.D.
D.G.I. (29.05.96)	N.D.	N.D.	N.D.
F.P.S. (06.03.96)	N.D.	N.D.	N.D.
J.B.S. (29.05.96)	N.D.	N.D.	N.D.

N.D.= NÃO DETECTÁVEL

N.R.= Não Realizado

**Tabela IX. Níveis de IL-4 (pg/ml) no Sobrenadante de Cultura de Linfócitos do Sangue Periférico de Indivíduos Normais.**

Pacientes	PHA(10 ug/ml)	MIBP(25ug/ml)	sem estímulo
1	0,74	N.D.	N.D.
2	331,7	N.D.	N.D.
3	375,0	N.D.	N.D.
4	4,0	N.D.	N.D.
5	140,2	N.D.	104,4
6	1,56	N.D.	N.D.
7	163,6	N.D.	N.D.
8	68,5	N.D.	N.D.
9	185,5	102,0	102,5
10	743,0	111,0	118,5
11	200,0	106,5	93,0

N.D.= Não detectável

**Tabela X. Níveis de IL-10 (pg/ml) no Sobrenadante de Cultura de linfócitos de Pacientes Portadores de Esclerose Múltipla em Remissão.**

PACIENTES	PHA(10µg/ml)	MBP(25µg/ml)	sem estímulo
L.M.D. (27.05.96)	1083.9	917.1	1198.2
A.M.F. (15.04.96)	496.9	606.6	307.0
A.M.F. (20.03.96)	1244.0	1145.5	1335.5
E.P.M.L. (27.03.96)	1075.5	1640.0	995.0
E.P.M.L. (22.05.96)	2004.5	3045.8	1856.2
C.R.B. (13.05.96)	1414.0	1568.5	1318.0
M.R. (22.03.96)	1447.5	1539.0	834.5
M.R. (08.05.96)	1956.3	2012.8	1252.6
H.C.T. (26.06.96)	2884.4	1647.9	1469.5
M.A.C. (26.06.96)	2561.1	986.2	572.5
M.A.C. (06.03.96)	875.7	573.4	555.0
S.S.J. (26.08.96)	1333.7	1919.7	1224.0
L.P. (19.08.96)	1883.3	983.5	1112.5
F.D.G.P. (26.08.96)	5123.9	1333.7	785.3
M.T.M. (06.03.96)	1417.5	1651.6	1647.9

N.D. = NÃO DETECTÁVEL

**Tabela XI. Níveis de IL-10 (pg/ml) no Sobrenadante de Cultura de Linfócitos em pacientes portadores de Esclerose Múltipla em surto.**

PACIENTES	PHA(10µg/ml)	MBP(25µg/ml)	sem estímulo
J.P. S. (19.06.96)	523.6	449.9	414.9
J.B.S. (29.05.96)	642.5	596.4	496.9
T.T.N. (24.04.96)	369.0	267.5	94.0
D.G.I. (29.05.96)	318.1	288.6	156.9
S.F.P.S. (04.03.96)	164.5	N.D.	328.5
L.M.L. (26.06.96)	1081.2	874.5	1795.1
F.D.G.P. (27.05.96)	581.1	288.6	156.9
F.P.S. (06.03.96)	1231.4	1100.5	1083.9

N.D. = NÃO DETECTÁVEL

**Tabela XII. Níveis de IL-10 (pg/ml) no Sobrenadante de Cultura de Linfócitos de Indivíduos Normais.**

INDIVÍDUOS	PHA(10 $\mu$ g/ml)	MBP(25 $\mu$ g/ml)	sem estímulo
1	2788.7	2603.3	2615.6
2	1291.3	2861.5	2496.6
3	266.5	696.9	161.5
4	632.4	369.7	251.8
5	290.5	121.8	N.D.
6	1083.9	396.5	186.4
7	703.3	530.1	265.6
8	1482.0	312.6	112.6
9	2547.3	676.6	787.2
10	1837.7	1893.0	957.7
11	3336.1	1856.2	1214.8
12	2119.7	855.4	287.7
13	3021.0	914.4	779.8
14	2092.1	1776.0	3029.3
15	1600.0	1994.4	4736.8
16	1181.6	2403.5	4666.9
17	2656.0	1511.5	1491.2

N.D. = NÃO DETECTÁVEL

**Tabela XIII. Níveis de TGF $\beta$  (pg/ml) no Sobrenadante de Cultura de Linfócitos de Pacientes Portadores de Esclerose Múltipla em Remissão.**

PACIENTES	PHA(10 $\mu$ g/ml)	MBP(25 $\mu$ g/ml)	sem estímulo
A.M.F. (15.04.96)	10.0	1690,0	2900,0
M.R. (08.05.96)	127.2	934.1	640.1
C.M.G. (06.03.96)	1280,0	103.9	2700,0
M.R. (20.03.96)	12.5	111.3	632.9
H.C.T. (26.06.96)	144.8	122.4	675.4
M.A.C. (26.06.96)	564.6	105.1	133.0
E.P.M.L. (25.03.96)	1580,0	549.7	2130,0
L.M.D. (27.05.96)	646.4	610.7	581.7
C.R.B. (20.03.96)	103.4	631.1	99.1
C.R.B. (13.05.96)	891.2	2760,0	972.9
E.P.M.L. (22.05.96)	2300,0	2400,0	2000,0
M.A.C. (06.05.96)	3710,0	4330,0	110.2
R.M.B. (06.05.96)	1900,0	1950,0	1500,0
M.R.C.M. (06.05.96)	551.9	2200,0	1000,0
N.N.A.O. (04.03.96)	N.R.	1340,0	2200,0

N.D. = NÃO DETECTÁVEL

N.R. = NÃO REALIZADO

**Tabela XIV. Níveis de TGF $\beta$  (pg/ml) no Sobrenadante de Cultura de Linfócitos de Pacientes Portadores de Esclerose Múltipla em Surto.**

PACIENTES	PHA(10 $\mu$ g/ml)	MBP(25 $\mu$ g/ml)	sem estímulo
F.D.G.P. (27.05.96)	510.2	104.7	528.5
T.T.N. (24.04.96)	637.9	101.8	2250,0
F.P.S. (06.03.96)	134.0	1900,0	12.0
J.B.S. (29.05.96)	1225,0	1909,2	610,0
L.M.L. (26.06.96)	915,7	542,6	317,0
H.C.T. (20.03.96)	128.6	12.1	1970,0
S.F.P.S. (04.03.96)	1350,0	2290,0	N.R.

N.D. = NÃO DETECTÁVEL N.R. = NÃO REALIZADO

**Tabela XV. Níveis de TGF $\beta$  (pg/ml) no Sobrenadante de Cultura de Linfócitos de Indivíduos Normais.**

INDIVÍDUOS	PHA(10 $\mu$ g/ml)	MBP(25 $\mu$ g/ml)	sem estímulo
1	116,9	15,7	127,2
2	2540,0	2660,0	3549,0
3	2700,0	3500,0	3700,0
4	1800,0	2310,0	3200,0
5	1820,0	N.R.	2370,0
6	50,5	N.R.	1750,0
7	1500,0	N.R.	2490,0
8	1850,0	N.R.	1890,0
9	11,1	94,0	93,5
10	118,3	135,7	423,1
11	99,4	690,2	521,2
12	575,4	405,4	384,6
13	506,2	515,4	586,9
14	9,91	9,13	10,1
15	1005,6	615,3	543,0

N.D. = NÃO DETECTÁVEL N.R. = NÃO REALIZADO

*REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- ABRAMS, J.S.; RONCAROLO, M.G.; YESSEL, H.; ANDERSSON, U.; GLEICH, G.J. & SILVER, J.E. Strategies of Anti-Cytokine Monoclonal Antibody Development: Immunoassay of IL-10 and IL-5 in Clinical Samples. *Immunol. Rev.* **127**, 5-24, 1992.
- BROD, S.A.; BENJAMIN, D. & HAFLER, D.A. Restrict T Cell Expression of IL2 / IFN- $\gamma$  mRNA in Human Inflammatory Disease. *J. Immunol.* **147**: 810-815, 1991.
- BROD, S.A.; KHAN, M.; BRIGHT, J.; SRIRAM, S.; MARSHALL, G.D. Jr; HENNIGER, E.M.; KERMANN, R.H. & WOLINSKY, J.S. Decreased CD3-Mediated Interferon- $\gamma$  Production in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *Ann. Neurol.* **37**: 546-549, 1995.
- CHEN, Y.; KUCHROO, V.K.; INOBE, J.I.; HAFLER, D.A. & WEINER, H.L. Regulatory T Cell Clones Induced by Oral Tolerance. Suppression of Autoimmune Encephalomyelitis. *Science.* **265**: 1237-1240, 1994.
- CHEN, Y.; INOBE, J.; MARKS, R.; GONNELLA, P.; KUCHROO, V.K. & WEINER, H.L. Peripheral Deletion of Antigen-Reactive T Cells Following Oral Tolerance. *Nature* **376**: 177-180, 1995.
- CHERNOFF, A.E.; GRANOWITZ, E.V.; SHAPIRO, L.; VANNIER, E.; LONNEMANN, G.; ANGEL, J.B.; KENNEDY, J.S.; RABSON, A.R.; WOLFF, S.M. & DINARELLO, C.A. A Randomized, Controlled Trial of IL-10 in Humans. *J. Immunol.* **154**: 5492-5499, 1995.

- CHOFFON, M.; JUILLARD, C.; GAUTHIER, G. & GRAU, G. Tumor Necrosis Factor Production as Possible Predictor of Relapse in Patients with Multiple Sclerosis. *Eur. Cytokine Netw.* **433**: 523-531, 1992.
- CORREALE, J.; GILMORE, W.; MCMILIAN, M.; MCCARTHY, K. THY, L. & WEINER, L. Patterns of Cytokines Secretion by Auto Reactive Proteolipid Protein Specific T Cell Clones During the Course of Multiple Sclerosis. *J. Immunol.* **154**: 2959-2968, 1995.
- CZARNIECKI, C.W.; CHIU, H.H.; WONG, G.A.W. Transforming Growth Factor  $\beta$  Modulates the Expression of Class II Histocompatibility Antigens on Human Cells. *J. Immunol.* **140**: 4217-4223, 1994.
- DEIBLER, G.E.; MARTENSON, R.E. & KIES, M.W. Large Scale Preparation of Myelin Basic Protein from Central Nervous Tissue of Several Mammalian Species. *Preparative Biochemistry* **2**: 139-165, 1972.
- EBERS, G.C.; SADOVNICK, A.D.; RISCH, N.J. Genetic Basis for Familial Aggregation in Multiple Sclerosis. *Nature* **377**: 150-151, 1995.
- ESPEVIK, T.; FIGARI, I.S.; SHALABY, M.R. Inhibition of Cytokine Production by Cyclosporin A and Transforming Growth  $\beta$ . *J. Exp. Med.* **166**: 571-576, 1987.
- FABRY, Z.; TOPHAM, D.J.; FEE, D.; HERLEIN, J.; CARLINO, J.; HART, M. & SRIRAM, S.J. TGF $\beta$  Decreases Migration of Lymphocytes *in vitro* and Homing of Cells Into The Central Nervous System *In Vivo*. *J. Immunol.* **155**: 325-332, 1995.

FERBER, I.A.; BROCKE, S.; TAYLOR-EDWARDS, C.; RIDGWAY, W.; DENISCO, C.; STEINMAN, L.; DALTON, D.; FATHMAN, C.G. Mice with a Disrupted IFN  $\gamma$  Gene are Susceptible to the Induction of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (E.A.E.). **J. Immunol.** **156**: 5-7, 1996.

KEHRL, J.H.; ROBETS, A.B.; WAKEFIELD, L.M.; JAKOWLEW, S.; SPORN, M.B. & FAUCI, A.S. Production Transforming Growth Factor  $\beta$  by Human T Lymphocytes and its Potential Role in the Regulation of T Cell Growth. **J. Exp.Med.** **163**: 1037-1050, 1986.

HAFLER, D.A. & WEINER, H.L. Multiple Sclerosis a CNS and Systemic Autoimmune Disease. **Immunology Today** **10**: 104-107, 1989.

KAPLAN, M.H.; SUN, Y.; HOEY, T.; GUSBY, M.J. Impaired IL-12 Responses and Enhanced Development of Th2 Cells in STAT Diference. **Nature** **382**: 174-177, 1996.

KARPUS, W.J.; GOULD, K.E. & SWANBORG, R.H.. CD4<sup>+</sup> Supressor Cells of Autoimmune Encephalomyelitis Respond to T Cell Receptor Associated Determinants on Effector Cells by Interleukin-4 Secretion. **Eur. J. Immunol.** **22**: 1757-1763, 1992.

KATZ, J.D.; BERNOIST, C.; MATHIS, D. T Helper Cell Subsets in Insulin Dependent Diabetes. **Science** **268**: 1185-1188, 1995.

KENNEDY, M.K.; TORRENCE, D.S.; PICHIA K.S. & MOHLER, K.M. Analysis of Cytokine mRNA Expression in the Central Nervous System of Mice with Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Reveals that IL-10 mRNA Expression Correlates with Recovery. **J. Immunol.** **149**: 2496-2505, 1992.

KHOURY, S.J.; HANCOCK, W.W. & WEINER, H.L. Oral Tolerance to Myelin Basic Protein and Natural Recovery from Experimental Autoimmune Encephalomyelitis is Associated with Downregulation of Inflammatory Cytokines and Differential Upregulation of Transforming Growth Factor  $\beta$ , IL4 and Prostaglandin E Expression in the Brain. **J. Exp. Med.** **176**: 1355-1364, 1992.

KHOURY, S.J.; AKALIN, E.; CHANDRAKER, A.; TURKA, L.A.; LINSLEY, P.S.; SAYEG, M.H.; HANCOCK, W.W. CD28-B7 Co-Stimulatory Blockade by CTLA-4 Ig Prevents Actively Induced Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Inhibits Th1 but Spares Th2 Cytokines in the Central Nervous System. **J. Immunol.** **155**: 4521-4524, 1995.

KUCHROO, V.K.; PRABHU, DAS, M.; BROWN, J.A.; RANGER, A.M.; ZAMVIL, S.S.; SOBEL, R.A.; WEINER, H.L.; NABAVI, N. & GLIMCHER, L.H. B7.1 and B7.2 Co-Stimulatory Molecules Activate Differentially the Th1 / Th2 Developmental Pathways: Application to Autoimmune Disease Therapy. **Cell** **80**: 707-718, 1995.

KUCHROO, V.K.; MARTIN, C.A.; GREER, J.M.; JU, S.T.; SOBEL, R.A. & DORF, M.E. Cytokines and Adhesion Molecules Contribute to the Ability of Myelin Proteolipid Protein-Specific T Cell Clones to Mediate Experimental Allergic Encephalomyelitis. **J. Immunol.** **151**: 4371-4382, 1993.

LIBLAU, R.S.; SINGER, S.M. & MCDEVITT, H.O. Th1 and Th2 CD4<sup>+</sup> T Cells in the Pathogenesis of Organ-Specific Autoimmune Diseases. **Immunol. Today.** **16**: 34-38, 1995.

LEE, H.M. & RICH, S. Co-Stimulation of T Cell Proliferation by Transforming Growth Factor  $\beta_1$ . **J. Immunol.** **19**: 2037-2041, 1991.

LIDER, O.; SANTOS, L.M.B.; LEE, C.S.Y.; HIGGINS, P.J. & WEINER, H.L. Suppression of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by the Oral Administration of Myelin Basic Protein. II. Suppression of Disease and In Vitro Immune Responses is Mediated by Antigen-Specific CD8<sup>+</sup> T Lymphocytes. **J. Immunol.** **142**: 748-752, 1989.

LYNCH, S.G. & ROSE, J.W. Multiple Sclerosis. **Disease-a-Month.** **42 (1)**: 1-5, 1996.

MAIMONE, D.; GREGORY, S.; ARNASON, B.G. & REDER, A.T. Cytokine Levels in the Cerebrospinal Fluid and Serum of Patients with Multiple Sclerosis. **J. Immunol.** **32**: 67-74, 1991.

- McCARNON, R.M.; SPATZ, M.; KEMPSKI, O.; HOGAN, R.N.; MUEHL, L. & MCFARLIN, D.E.. Interaction Between Myelin Basic Protein-Sensitized T Lymphocytes and Murine Cerebral Vascular Endothelial Cells. **J. Immunol.** **137 (11):** 3428-3435, 1986.
- McFARLIN, D.E. & McFARLAND, H.F. Multiple Sclerosis. **N. Engl. J. Med.** **307:** 1183-1188, 1982.
- MERRIL, J.E. & BENVENISTE, E.N. Cytokines in Inflammatory Brain Lesions: Helpful and Harmful. **Trends. Neurosci.** **19:** 331-338, 1996.
- MILLER, A.; LIDER, O. & WEINER, H.L. Antigen Driven Bystander Suppression Following Oral Administration of Antigens. **J. Exp. Med.** **174:** 791-798, 1991.
- MILLER, A.; AL-SABBAGH, A.; SANTOS, L.M.B.; PRABHUDAS, M. & WEINER, H.L. Epitopes of Myelin Basic Protein that Trigger TGF $\beta$  Release After Oral Tolerization are Distinct from Encephalitogenic Epitopes and Mediate Epitope-Driven Bystander Suppression. **J. Immunol.** **151:** 7307-7315, 1993.
- MOKHTARIAN, F.; SHI, Y.; SHIRAZIAN, D.; MORGANTE, L.; MILLER, A. & GROB, D. Defective Production of Anti-Inflammatory Cytokine, TGF $\beta$  by T Cell Lines of Patients with Active Multiple Sclerosis. **J. Immunol.** **152:** 6003-6011, 1994.
- MOSMANN, T.R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M.W.; GIDLIN, M.A. & COFFMAN, R.L. Two Types of Murine Helper T Cell Clone. I. Definition According to Profiles of Lymphokine Activities and Secreted Proteins. **J. Immunol.** **136:** 2348-2357, 1986.

- MUSETTE, P.; BENVENISTE, O.; LIM, A.; BEQUET, D.; KOURILSKY, P.; DORMONT, D. & GACHELIN, G. The Pattern of Production of Cytokine mRNA is Markedly Altered at the Onset of Multiple Sclerosis. **Res. Immunol.** **147**: 435-441, 1996.
- NAVIKAS, V. & LINK, H. Review: Cytokines and the Pathogenesis of Multiple Sclerosis. **J. Neurosc. Res.** **45**: 322-333, 1996.
- NICHOLSON, L.B. & KUCHROO, V.K. Manipulation of the Th1 / Th2 Balance in Autoimmune Disease. **Cur. Opin. Immunol.** **8**: 837-842, 1996.
- OLSSON, T. Cytokines in Neuroinflammatory Disease: Role of Myelin Autoreactive T Cell Production of Interferon-Gamma. **J. Neuroimmunol.** **40**: 211-218, 1993.
- ORTALDO, J.R.; MASON, A.T.; O'SHEA, J.J.; SMITH, M.J.; FALK, L.A.; KENNEDY, I.C.S.; LONGO, D.L.; RUSCETTI, R.W. Mechanistic Studies of Transforming Growth Factor  $\beta$  Inhibition of IL-2-Dependent Activation of CD3-Large Granular Lymphocyte Function of IL-2R $\beta$  (p75) Signal Transduction. **J. Immunol.** **146**: 3791-3798, 1991.
- OTA, K.; MATSUI, M.; MILFORD, E.L.; MACKIN, G.A.; WEINER, H.L. & HAFLER, D.A. T-Cell Recognition of an Immunodominant Myelin Basic Protein Epitope in Multiple Sclerosis. **Nature.** **346**: 183-187, 1990.
- PAUL, W.S. & SEDER, R.A. Lymphocyte Responses and Cytokines. **Cell.** **76**: 242-251, 1994.

POSER, C.; PATY, D.W.; SCHEINBERG, L.; MCDONALD, W.I.; DAVIS, F.A.; EBERS, G.G.; JHONSON, K.P.; SIBLEY, W.A.; SILBERBERGER, D.H. & TORTELLONIC, W.W. New Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis: Guidelines for Research Protocols. **Ann. Neurol.** **13**: 227-231, 1983.

PRINEAS, J.W. & GRAHAN, J.S. Lymphocyte Response and Cytokines. **Ann. Neurol.** **10**: 149-158, 1981.

RACKE, M.K.; BONOMO, A.; SCOTT, D.E.; CANNELLA, B.; LEVINE, A.; RAINER, C.S.; SHEVACH, M. & RÖCKEN, M. Cytokines-Induced Immune Deviation as a Therapy for Inflammatory Autoimmune Disease. **J. Exp. Med.** **180**: 1961-1966, 1994.

RIECKMANN, P.; ALBRECHT, M.; KITZE, B.; TUMANI, H.; BROOCKS, A.; LÜER, W.; POSER, S. Cytokine mRNA Levels in Mononuclear Blood Cells from Patients with Active Multiple Sclerosis. **Neurology.** **44**: 1523-1526, 1994.

RIECKMANN, P.; ALBRECHT, M.; KITZE, B.; WEBER, T.; TUMANI, H.; BROOCKS, A.; LÜER, W.; HELWING, A. & POSER, S. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Messenger RNA Expression in Patients with Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis is Associated with Disease Activity. **Ann. Neurol.** **37**: 82-88, 1995.

ROMAGNANI, S. Lymphokine Production by Human T Cells in Disease States. **Ann. Rev. Immunol.** **12**: 227-257, 1994.

- ROTT, O.; FLEISHER, B. & CASH, B. Interleukin-10 Prevents Experimental Allergic Encephalomyelitis in Rats. **Eur. J. Immunol.** **24**: 1434-1440, 1994.
- RUDDLE, N.H.; BERGAMAN, C.M.; MCGRATH, K.M.; LINGENHELD, E.G.; GRUNNET, M.L.; PADULA, S.J. & CLARK, R.B. An Antibody to Lymphotoxin and Tumor Necrosis Factor Prevents Transfer of Experimental Allergic Encephalomyelitis. **J. Exp. Med.** **1723**: 1193-1200, 1990.
- SELMAJ, K.; RAINE, C.S. & CROSS, A.H. Anti-Tumor Necrosis Factor Therapy Abrogates Autoimmune Demyelination. **Ann. Neurol.** **36**: 694-700, 1991.
- SHARIEF, M.K. & HENTEGES, R. Association Between Tumor Necrosis Factor Alpha and Disease Progression in Patients with Multiple Sclerosis. **N. Engl. J. Med.** **325**: 467-472, 1991.
- SIELP, C.; BODMER, S.; FREI, K.; MCDONALD, H.R.; DE MARTIN, R.; HOFER, E. & FONTANA, A. The Glioblastoma-Derived T Cell Suppressor Factor/ Transforming Growth Factor- $\beta$  Inhibits T Cell Growth without Affecting the Interaction of Interleukin 2 with its Receptor. **Eur. J. Immunol.** **18**: 593-600, 1988.
- SHER, A.L. & COFFMAN, R.L. Regulation of Immunity to Parasites and T Cell-Derived Cytokines. **Ann. Rev. Immunol.** **10**: 385-409, 1992.
- TISUNAWAKI, S.M.; SPORN, A.; DING, A. & NATHAN, C. Deactivation of Macrophages by TGF- $\beta$ . **Nature.** **334**: 260-267, 1988.

- TRAUGOTT, U. & LEBON, P. Multiple Sclerosis: Involvement of Interferons in Lesion Pathogenesis. **Ann. Neurol.** **24**: 243-251, 1988.
- TSUKADA, N.; MIAGI, K.; MATSUDA, M.; YANAGISAWA, N. & YONE, K. Tumor Necrosis Factor and Interleukin-1 in CSF and Sera of Patients with Multiple Sclerosis. **J. Neuroimmunol.** **102**: 230-234, 1991.
- WAKSMAN, B. Mechanisms in Multiple Sclerosis. **Nature.** **318**: 104-105, 1985.
- WINDHAGEN, A.; NEWCOMBE, J.; DANGOND, F.; LI, H.; WOODROOFE, N.; CUZNER, M.L. & HAFLER, D.A. Expression of IL-12 and B7 Costimulatory Molecules in Multiple Sclerosis Lesions. **J. Exp. Med.** **182**: 1985-1996, 1995.
- WEINER, H.L.; FRIEDMAN, A.; MILLER, S.J.; KHOURY, S.J.; AL-SABBAGH, A.; SANTOS, L.M.B.; SAYEGH, M.; NUSSENBLATT, R.B.; TRENTAM, D.E. & HAFLER, D.A. Oral Tolerance: Immunologic Mechanisms and Treatment of Animal and Human Organ-Specific Autoimmune Disease by Oral Administration of Autoantigens. **Ann. Rev. Immunol.** **12**: 809-837, 1994.
- WOODROOFE, M.N. & CUZNER, M.L. Cytokine mRNA Expression in Inflammatory Multiple Sclerosis Lesions: Detection by Non-Radioactive in situ Hybridization. **Cytokine.** **5**: 583-588, 1993.
- WUCHERPFENNING, K.W. & STOMINGER, J.L. Molecular Mimicry in T Cell-Mediated Autoimmunity: Viral Peptides Activate Human T Cell Clones Specific for Myelin Basic Protein. **Cell** **80**: 695-705, 1995.

YESSEL, H.; DE WAAL MALEFYT, R.; RONCAROLO, M.G.; ABRAMS, J.S.; LAHESMAA, R.; SPITES, H. & DE VRIES, J.E. IL-10 is Produced by Human CD4 T Cell Clones and Peripheral Blood T Cells. **J. Immunol.** **149**: 2378-2384, 1992.

ZAMVIL, S.S. & STEINMAN, L. The T Lymphocyte in Experimental Allergic Encephalomyelitis. **Ann. Rev. Immunol.** **8**: 579-621, 1990.

ZHANG, J.; MEDAER, R.; CHIN, Y.; VAN DEN BERG-LOONEN, E. & RAUS, J.C. Myelin Basic Protein-Specific T Lymphocytes in Multiple Sclerosis and Controls: Precursor Frequency, Fine Specificity and Cytotoxicity. **Ann. Neurol.** **32**: 330-338, 1992.

ZIPP, F.; WEBER, F.; SOUGIU, S.; HOLLER, E.; WEISS, E.H.; WEKERLE, H. Antigen-Specific T Cell Lines from HLA-DR2 positive Individuals: Implications for Multiple Sclerosis. 4<sup>th</sup> Meet. Eur. Neurol. Soc., 1994.