

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Gláucia Monteiro de Castro

**ESTUDO DA AÇÃO IMUNOMODULADORA DE
GANGLIOSÍDEOS SOBRE A EVOLUÇÃO DA
ENCEFALOMIELITE EXPERIMENTAL AUTOIMUNE
(EAE) EM RATOS LEWIS**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Gláucia Monteiro de Castro
e aprovada pela Comissão Julgadora.

11/8/99

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título
de Mestre em Ciências Biológicas
na área de Biologia Celular



Orientador: Prof. Dr. Francesco Langone

Co-Orientadora: Profa. Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos

1999

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

9913692

UNIDADE	BC		
N.º CHAMADA:			
V.	Ex.		
TOMBO BC/	28340		
PROC.	229199		
C	<input type="checkbox"/>	D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00		
DATA	21/10/99		
N.º CPD			

CM-00136297-4

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

Castro, Gláucia Monteiro de

C279e

Estudo da ação imunomoduladora de gangliosídeos sobre a evolução da encefalomielite auto-imune experimental (EAE) em ratos Lewis/Gláucia Monteiro Castro . - Campinas. SP: [s.n.], 1999.

107f.:ilus.

Orientador: Francesco Langone

Co-Orientador: Leonilda Maria Barbosa dos Santos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia

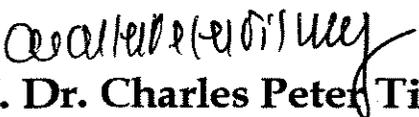
1. Encefalomielite alérgica experimental. 2. Tumor-alpha - necrose. 3. Esclerose múltipla. I Langone, Francesco. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título

Defesa de Tese realizada em 11 de agosto de 1999

BANCA EXAMINADORA



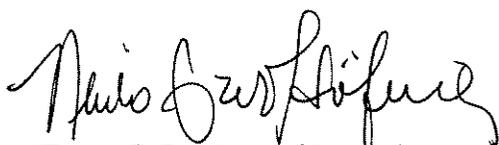
Prof. Dr. Francesco Langone



Prof. Dr. Charles Peter Tilbery



Prof. Dr. Ricardo de Lima Zöllner



Profa. Dra. Maria Alice da Cruz-Höfling

*"O amor de Deus vem antes e depois
e vai além dos sonhos que aprendi..."*

(autor desconhecido)

Ao meu pai Antônio, obrigado por todo seu amor, dedicação e carinho, gostaria de sua presença nesse momento.

À minha mãe Gisélia e minha irmã Viviane, companheiras em tudo, nenhuma palavra seria capaz de descrever todo amor e gratidão.

Aos meus irmãos Cláudia, Roberto, Adriane e Júlio, pelo apoio constante, amor e paciência no decorrer desses dois anos de mestrado.

Aos meus sobrinhos Victor e Vanessa que em sua inocência foram capazes de me dar a coragem para prosseguir nos momentos mais difíceis.

À minha professora Miralva Aparecida de Jesus Silva, encorajadora, irmã e mestra, desde os tempos da graduação, que me mostrou a beleza do aprendizado e da docência.

Reconhecimento

*Ao Prof. Dr. Francesco Langone pela confiança em mim depositada,
orientação segura e profissionalismo*

*À Profa. Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos, pelo uso de seu
laboratório, pela viabilização dos estudos imunológicos, mas principalmente,
pela orientação segura, apoio e pela lição de vida.*

AGRADECIMENTOS

Aos Profs. Drs. Charles Peter Tilbery, Ricardo de Lima Zollner e Maria Alice da Cruz-Höfling pela prontidão na leitura e análise do trabalho e por suas valiosas sugestões para o aprimoramento do mesmo.

À Profa. Dra. Shirley Maria Recco Pimentel, minha profunda gratidão por todo apoio concedido em todas as fases da execução deste trabalho.

À Profa. Dra. Maria Alice da Cruz Höfling não só por todo apoio e colaboração que me deu ao longo da elaboração da tese, mas também pelo exemplo de profissionalismo e humanidade.

Às minhas mais que amigas Paty Aline, Luciana, Blanca e Silvia, que Deus possa um dia retribuir todo auxílio, carinho e apoio que recebi.

À Celinha e Elaine, sempre prontas a ajudar e por suas palavras de encorajamento e fé.

À Lílian Alves Senne Panagio (Lili) do Departamento de Biologia Celular, por sua presteza, boa vontade, por tudo que me ajudou.

Aos meus irmãos Roberto e Cláudia por sempre acreditarem em mim, pelo auxílio na obtenção de meu diploma, pela impressão das várias versões da tese e intermináveis caronas para realizá-la.

À minha irmãzinha Vivi, pelas idas e vindas à UNICAMP, injeções, seminários, enfim por tudo.

Ao meu irmão Júlio pelas caronas nos sábados e domingos à noite.

À Mônica, Adrienne, João Marcos, Paty Dourado, Érica e Celina pela companhia, cumplicidade e amizade sempre presentes.

Ao Sidney Henrique Simões do Departamento de Biologia Celular por sua constante boa vontade e paciência.

Ao meu amigo Júnior pelas infindáveis vezes em que pedi seu auxílio e sempre encontrei apoio.

Ao Prof. Dr. Norair Salviano dos Reis grande amigo e incentivador.

À Rosa minha amiguinha do coração, sempre pronta a me auxiliar.

À minha mãe do Mato Grosso Dorothy, pelo "colo".

Aos primos Júlio, Angélica, Inez e Kátia, por me fazerem acreditar na realização de um sonho.

Aos primos Regina e Rogério pelo constante incentivo e pelo auxílio na conclusão da tese.

Ao Prof. Dr. Romário de Araújo Mello pelo constante incentivo e pelo empréstimo da ocular de morfometria.

Ao Dr. Aguielo Cunha por todos os momentos em que recebi seu apoio e compreensão.

Às amigas Márcia Piva e Fátima Chaves, minha gratidão.

Ao amigo Arnaldo amigo sempre presente, minha gratidão pelo apoio constante.

À Claudinete e Cleusa do Laboratório de Imunoistoquímica do Departamento de Histologia e Embriologia por sua colaboração constante.

À Cristina e Dirce do Departamento de Microbiologia e Imunologia pelas longas discussões técnicas e pela colaboração na elaboração dos protocolos.

Ao Sr. Antônio Alves do Departamento de Microbiologia e Imunologia pelo cuidado com os animais.

À Mércia, Jairo e Adriana do Departamento de Fisiologia e Biofísica pelo encorajamento nos momentos difíceis.

Aos amigos Paulo e Djanira do Departamento de Anatomia pela amizade.

Ao Prof. Dr. Boschero e Profa. Helena do Departamento de Fisiologia e Biofísica pelo uso das instalações de seu laboratório e pela viabilização das leituras de TGF- β e Linfoproliferação.

Ao Prof. Dr. Áureo Tatsumi Yamada pelo uso do criostato, fotomicroscópio e das instalações de seu laboratório e, principalmente, pelas sugestões dadas durante a realização do trabalho.

Ao Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro pelas sugestões e empenho em me auxiliar.

À Profa. Dra. Iara Maria Silva De Lucca pelas suas sugestões e exemplo de docência.

À Profa. Dra. Maria Lúcia Wada pelo uso de seu fotomicroscópio e por sua atenção.

À Profa. Dra. Mary Ann Heidi Dolder pelo seu auxílio nas correções de texto em inglês e pelo carinho destes anos de convivência.

À Profa. Dra. Maria do Carmo Rincon pelo uso da palette.

Ao Sr. Francisco, Dona Josefa, Viviane, Lécio e Washington do Departamento de Fisiologia e Biofísica por todas as vezes em que me auxiliaram.

Ao Prof. Dr. Luís Antônio Pereira Violin pelas sugestões e encorajamento

À Rita e Helena do Departamento de Histologia e Embriologia por sua boa vontade e gentileza.

Aos animais, estes pequenos seres, que tornam possível o desenvolvimento da ciência.

Chorei por cada um deles e agradei a Deus por sua existência...

A todos os docentes dos Departamentos de Biologia Celular e Histologia e Embriologia pela convivência e contribuição à minha formação profissional.

Aos amigos do Curso de Pós Graduação em Biologia Celular e Histologia e Embriologia

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

À TRB Pharma pelo fornecimento dos gangliosídeos utilizados no presente trabalho

À CAPES pelo apoio financeiro e concessão da bolsa de estudos.

Sumário

ÍNDICE DE FIGURAS	10
RESUMO	12
ABSTRACT	13
ABREVIATURAS UTILIZADAS	14
1. INTRODUÇÃO	15
1.1. BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA	21
1.2. CÉLULAS DA GLIA	23
1.3. LINFÓCITOS T CD4+ TH1, TH2, TH3 E CITOCINAS	26
1.3.1 FATOR DE NECROSE TUMORAL α (TNF- α)	28
1.3.2. FATOR TRANSFORMADOR DE CRESCIMENTO - β (TGF- β)	30
1.4. GANGLIOSÍDEOS	32
2. OBJETIVOS	40
3. MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1. ANIMAIS E INDUÇÃO DA EAE	43
3.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS	43
ANIMAIS NORMAIS	44
3.3 EVOLUÇÃO CLÍNICA	44
3.4 ANÁLISE MORFOLÓGICA	44
3.4.1. SACRIFÍCIO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS E OBTENÇÃO DOS ESPÉCIMES PARA ESTUDO	
HISTOLÓGICO	44
3.4.2. IDENTIFICAÇÃO DE ASTRÓCITOS ATRAVÉS DE IMUNOPEROXIDASE	45
3.4.3. DETECÇÃO DE LINFÓCITOS CD4+ E CD8+	46
3.4.4. QUANTIFICAÇÃO DOS INFILTRADOS INFLAMATÓRIOS	47
3.5. ANÁLISE IMUNOLÓGICA	47
3.5.1. OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE BAÇO	47
3.5.2 CULTURA DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE BAÇO	48
3.5.3. PRODUÇÃO DE TNF- α	49

3.5.4. PRODUÇÃO DE TGF- β	50
3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
4. RESULTADOS	52
<hr/>	
4.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA	53
4.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA	59
4.2.1. INFILTRADOS INFLAMATÓRIOS	59
4.2.2. IDENTIFICAÇÃO DE ASTRÓCITOS	59
4.2.3. DETECÇÃO DE LINFÓCITOS CD4+ E CD8+	60
4.2.3. QUANTIFICAÇÃO	60
4.3 ENSAIO DE LINFOPROLIFERAÇÃO	67
4.4 PRODUÇÃO DE TNF-α	71
4.5 PRODUÇÃO DE TGF-β	76
5. DISCUSSÃO	81
<hr/>	
6. CONCLUSÕES	95
<hr/>	
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
<hr/>	

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 2a - Escore clínico médio dos animais sacrificados no 19ºdpi</i>	57
<i>Figuras 2b e 2c - Gráficos da variação e porcentagem da perda de peso</i>	57
<i>Figura 3a - Escore clínico médio dos animais sacrificados no 15ºdpi</i>	58
<i>Figura 3b e 3c - Gráficos da variação e porcentagem da perda de peso</i>	58
<i>Prancha 1. Fotomicrografias de cortes do tecido nervoso, coradas com hematoxilina e eosina</i>	62
<i>Prancha 2. Fotomicrografias de cortes obtidos por congelação onde foi realizada imunomarcção para detecção de GFAP em animais sacrificados no 19ºdpi</i>	63
<i>Prancha 3 - Fotomicrografias de cortes obtidos por congelação nos quais foi realizada imunofluorescência para detecção de linfócitos T CD4+</i>	64
<i>Prancha 4. Fotomicrografias de cortes obtidos por congelação nos quais foi realizada imunofluorescência para detecção de linfócitos T CD8+</i>	65
<i>Figura 4 - Média da contagem de infiltrados inflamatórios</i>	66
<i>Figura 5 - Ensaio de linfoproliferação dos animais sacrificados no 15ºdpi</i>	70
<i>Figura 6 - Ensaio de linfoproliferação dos animais sacrificados no 19ºdpi</i>	70
<i>Figura 7 - Dosagem TNF-α em sobrenadante de cultura celular obtida de animais sacrificados no 15ºdpi</i>	74

<i>Figura 8 - Dosagem TNF-α em sobrenadante de cultura celular obtida de animais sacrificados no 19^odpi.....</i>	<i>74</i>
<i>Figuras 9a e 9b - Comparação dos níveis de TNF-α obtidos no 15^odpi e 19^odpi.....</i>	<i>75</i>
<i>Figura 10 - Dosagem de TGF-β em sobrenadante de cultura celular obtida de animais sacrificados no 15^odpi.....</i>	<i>79</i>
<i>Figura 11 - Dosagem de TGF-β em sobrenadante de cultura celular obtida de animais sacrificados no 19^odpi.....</i>	<i>79</i>
<i>Figura 12a e 12 b - Comparação dos níveis de TGF-β obtidos no 15^odpi e 19^odpi.....</i>	<i>80</i>

Resumo

A encefalomielite experimental autoimune (EAE) é uma doença mediada por linfócitos T CD4, que penetram através da barreira hematoencefálica promovendo uma reação inflamatória local e edema, responsáveis pela ocorrência das deficiências neurológicas da doença. Como modelo da esclerose múltipla, a EAE tem sido usada na avaliação de estratégias terapêuticas. No presente trabalho, nós investigamos o efeito do tratamento com gangliosídeos na evolução da encefalomielite experimental autoimune. Para tanto foi realizado estudo morfológico/morfométrico, imunoistoquímico, ensaio de linfoproliferação e dosagem de fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e fator transformador de crescimento- β (TGF- β). Os resultados mostram que a administração de gangliosídeos na fase efetora leva à supressão parcial ou total dos sinais clínicos, refletindo-se na contagem de infiltrados, onde o número destes foi significativamente menor no cérebro. A avaliação imunológica demonstrou que os animais tratados com gangliosídeos apresentam níveis significativamente menores de TNF- α , uma das principais citocinas envolvidas na gênese da EAE. Estes resultados comprovam a ação imunomoduladora dos gangliosídeos na evolução da EAE, relacionada com a provável inibição na produção do TNF- α devido a supressão na proliferação de linfócitos Th1, o que leva a propor a possibilidade de um novo agente terapêutico para o tratamento da esclerose múltipla.

Abstract

The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is a disease mediated by CD4 T cells, that penetrate nervous tissue across the blood-brain barrier and promote a local inflammatory reaction and edema, responsible for the occurrence of the neurological deficits of the disease. As a model of the multiple sclerosis, EAE has been used for the evaluation of therapeutic strategies for this pathological condition. In the present work, we investigated the effect on EAE evolution of treatment with gangliosides. The disease was induced in Lewis rats and they received two daily doses of the gangliosides mixture (100mg/Kg). The Lewis rats were accompanied for clinical evaluation and sacrificed for morphological, morphometric, and immunohistochemical analysis of the nervous tissue. We also made a proliferation assay, tumor necrosis factor- α (TNF- α) and transforming growth factor- β (TGF- β) dosage. The results showed that the administration of gangliosides in the effector phase of EAE leads to the partial or total suppression of the clinical signs. This finding was validated by the significantly lesser number of inflammatory cell infiltrations in the brain of treated animals. Moreover, the TNF- α levels were smaller in Lewis rats that were immunized and received gangliosides. Our results showed very strong immunomodulatory action of the gangliosides on the evolution of EAE, suggesting that these compound may have an important role in multiple sclerosis therapeutics.

Abreviaturas Utilizadas

APC	Células apresentadoras de antígeno
bFGF	Fator de crescimento de fibroblasto ^{básico}
BHE	Barreira hematoencefálica
CFA	Adjuvante completo de Freund
CSF	Fator estimulante de colônia
CTL	Linfócito T citotóxico
DAB	3,3'diaminobenzidina
dpi	Dias pós-inoculação
EAE	Encefalomielite experimental autoimune
EM	Esclerose múltipla
GFAP	Proteína fibrilar glial astrocítica
GP-MBP	Proteína básica de mielina de cobaia
HE	Hematoxilina e Eosina
ICAM-1	Molécula de adesão celular intercelular-1
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleucina
LFA-1	Antígeno associado à função linfocitária-1
LPS	Lipopolissacarídeo
LT- α	Linfotoxina- α
MAG	Glicoproteína associada à mielina
MBP	Proteína básica de mielina
MHC-II	Complexo de histocompatibilidade principal II
MOG	Glicoproteína de mielina do oligodendrócito
<i>Mt</i>	<i>Micobacterium tuberculosis</i>
NGF	Fator de crescimento neural
NK	Linfócito <i>natural killer</i>
NO	Óxido nítrico
PBS	Tampão fosfato salina
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaqueta
PLP	Proteína de proteolipídeo
SNC	Sistema nervoso central
TCR	Receptor de linfócito T
TGF- β	Fator transformador do crescimento- β
Th1	Linfócito T helper 1
Th2	Linfócito T helper 2
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular
VLA-4	Antígeno tardio-4

1. Introdução

Para a maioria dos tecidos, a inflamação é um evento protetor, servindo para confinar e destruir tecidos lesados e os agentes perniciosos. Entretanto, no sistema nervoso central (SNC), onde a expressão constitutiva de moléculas do sistema imune é mínima e o tráfico de componentes circulantes do sistema imune é impedido pela barreira hematoencefálica, o processo inflamatório pode ter conseqüências gravíssimas (RAINE & PATH, 1994).

A esclerose múltipla (EM) é uma doença crônica inflamatória do SNC, caracterizada pela infiltração de células do sistema imune, destruição localizada da mielina e perda de oligodendrócitos (EWING & BERNARD, 1998). Sua etiologia é desconhecida, mas evidências clínicas, histopatológicas, imunológicas e genéticas indicam que a lesão do tecido é resultado da resposta imune voltada contra os constituintes da mielina (BROSNAN & RAINE, 1994).

Sua ocorrência é primariamente em adultos jovens, sendo que os primeiros sintomas surgem entre 20 e 45 anos, raramente manifestando-se antes dos 15 anos ou após os 50 anos. Clinicamente, durante os surtos, os pacientes podem apresentar vertigem, tremores, falta de coordenação, espasticidade aumentada, depressão, oscilação de humor, anormalidades cognitivas, disfunção sexual, ataxia, constipação intestinal, incontinência urinária, fadiga, neurite óptica, quadriparesia, disartria, perda de coordenação das extremidades superiores e disestasia (LYNCH & ROSE, 1996).

A patologia da EM é caracterizada pela presença de placas desmielinizadas com inflamação perivascular, restritas à substância branca do SNC (LYNCH & ROSE,

1996). Em todas as lesões predominam linfócitos e macrófagos, mas a extensão da destruição de oligodendrócitos depende do estágio da lesão, que pode ser ativa inicial, ativa tardia ou crônica. Embora sejam observados axônios intactos nas placas desmielinizadas, o dano axonal pode ser inferido pela presença de precursor de proteína amilóide, observada nas bordas ativas da lesão, que coincide com a localização de macrófagos no local, sugerindo que a reação imuno-mediada não está restrita à mielina (AMOR *et al.*, 1997).

Na EM os contínuos ataques do sistema imune ao SNC, constituídos de períodos de surtos e remissões, reduzem a capacidade de remielinização das lesões, resultando na formação de placas permanentes de tecido cicatricial glial. Além disso há redução no número de neurônios e conseqüentes deficiências neurológicas irreversíveis (TOURBAH *et al.*, 1997).

Embora os antígenos específicos, responsáveis pela resposta autoimune na EM não tenham sido totalmente determinados, postula-se que este processo seja iniciado quando macrófagos que expressem moléculas do complexo de histocompatibilidade principal classe II (MHC-II) apresentem peptídeos antigênicos próprios modificados aos receptores de linfócitos T (TCR) nas células T helper 1 (Th1). Durante a apresentação do antígeno, tem particular importância a presença de moléculas co-estimulatórias como a B7 e CD28. Posteriormente, leucócitos marginam a luz endotélio vascular cerebral ligando-se fracamente à este através de moléculas de adesão, como o antígeno tardio-4 (VLA-4) e antígeno associado à função linfocitária-1 (LFA-1). Estas moléculas ligam-se de forma complementar à molécula de adesão

celular vascular-1 (VCAM-1) e à molécula de adesão celular intercelular-1 (ICAM-1) na superfície das células endoteliais. A liberação de proteases pelos leucócitos lesam o tecido e facilitam a diapedese dessas células para o parênquima cerebral. Desta forma a destruição da mielina seria mediada por células T que secretariam o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), tóxico para oligodendrócitos e por macrófagos que a fagocitam. Os macrófagos também liberam TNF- α , radicais livres do oxigênio, óxido nítrico (NO) e proteases. A destruição da mielina ocorre ainda pela ação de linfócitos B que diferenciam-se em plasmócitos, secretando anticorpos que ativam o sistema complemento, promovendo o ataque à bainha de mielina (ANDERSON & GOODKIN, 1998).

A compreensão destes mecanismos é importante para o esclarecimento da patogênese de doenças autoimunes como a EM e formulação de estratégias terapêuticas para intervenção imune. Neste sentido o emprego do modelo experimental da EM, a encefalomielite experimental autoimune (EAE), tem trazido grandes contribuições (EWING & BERNARD, 1998).

A primeira descrição da EAE foi feita por RIVERS e colaboradores em 1933. Estes autores demonstraram que a encefalomielite aguda disseminada, que ocasionalmente ocorre em pacientes após a vacinação contra raiva, poderia ser reproduzida em macacos por repetidas injeções de extrato de cérebro de coelho (MACEDO *et al.*, 1996).

A EAE é considerada um modelo adequado para o estudo da EM, uma vez que mimetiza os eventos autoimunes induzidos pela imunização dos animais com autoantígenos, agora bem caracterizados. Assim como a EM, a EAE é uma doença mediada por linfócitos T CD4+, que apresenta quebra da barreira hematoencefálica, processos inflamatórios e desmielinizantes (RIDGWAY *et al.*, 1994; DIAB *et al.*, 1997; VILLAROYA *et al.*, 1997).

Em linhagens de animais susceptíveis à EAE, sua indução pode ser feita empregando-se várias estratégias: imunização com o vírus da encefalomielite murina de Theiler, com homogeneizado de SNC, ou com proteínas da mielina, tais como, a proteína básica de mielina (MBP), proteína de proteolípídeo (PLP), glicoproteína associada à mielina (MAG) e glicoproteína de mielina do oligodendrócito (MOG) ou com peptídeos encefalitogênicos dessas proteínas. Estas proteínas e seus peptídeos são utilizadas na preparação do inóculo com a presença de adjuvantes apropriados, como o adjuvante completo de Freund (CFA), nos procedimentos de indução (ENCINAS *et al.*, 1996).

A indução da EAE pode ainda ser feita através da transferência adotiva de linfócitos T reativos à MBP ou PLP (TSUNODA *et al.*, 1996; CONSTANTINESCU *et al.*, 1998). Conforme o protocolo de indução e a linhagem do animal, a doença pode apresentar-se sob a forma aguda monofásica ou sob a forma crônica com ataques e remissões.

A forma monofásica aguda pode ser induzida em ratos Lewis por imunização ativa com autoantígenos purificados de mielina em adjuvante completo de Freund

(CFA), ou por transferência adotiva. Em ambos os casos a doença é caracterizada por uma doença paralisante ascendente, que primeiro afeta a cauda e os membros posteriores, progredindo para os membros anteriores, levando eventualmente à morte. O exame histopatológico demonstra que a doença clínica na forma monofásica aguda está associada à inflamação do parênquima perivascular (WEKERLE *et al.*, 1994).

Após indução ativa a doença ocorre em duas fases: 1) Fase indutora, que compreende a apresentação de epítomos da mielina a linfócitos T CD4+ nos órgãos linfóides periféricos com subsequente expansão e diferenciação destas em células efectoras Th1, que secretam citocinas pró-inflamatórias; e 2) Fase efetora, que consiste na migração de linfócitos mielina-específicos ativados para o SNC, levando à quebra da barreira hematoencefálica (BHE). Ocorre neste momento a apresentação de epítomos da mielina por células apresentadoras de antígenos (APC) aos linfócitos T no SNC. Concomitantemente há a expressão de quimioquinas e citocinas por linfócitos T encefalitogênicas e por células residentes ativadas do SNC, como os astrócitos e as micróglias, as quais, em conjunto, recrutam um grande número de células mononucleares para o parênquima do SNC. Assim, a desmielinização dos tratos axonais ocorre pela atividade fagocítica de células mononucleares ativadas e pela provável ação citotóxica, direta ou indireta, de moléculas efectoras solúveis como interferon γ (IFN- γ), linfotoxina α (LT α), fator de necrose tumoral α (TNF- α), óxido nítrico (NO), enzimas proteolíticas e radicais de oxigênio, todos liberados por linfócitos CD4+ e macrófagos/micróglias ativados (MILLER & SHEVACH, 1998).

1.1. Barreira Hematoencefálica

A BHE presente nos capilares do SNC, é formada por endotélio não fenestrado, associado aos pés astrócitários e prolongamentos dos pericitos e micróglia perivascular. As células endoteliais estão envolvidas pela lâmina basal e estão unidas por uma complexa rede de junções do tipo "tight", que impedem a difusão paracelular. Os pericitos são células contráteis caracterizadas por longos prolongamentos que circundam os capilares cerebrais, fornecendo suporte estrutural aos vasos (BALABANOV & DORE-DUFFY, 1998). Além de outras inúmeras funções, os pericitos também controlam o transporte de macromoléculas através da BHE por meio de endocitose de compostos que consigam cruzar a barreira endotelial. Devido ao íntimo contato com as células endoteliais, pericitos e astrócitos em conjunto mantêm a integridade dos capilares cerebrais e auxiliam na função de barreira do SNC contra a invasão de agentes externos (ENGELHARDT, 1996; DE VRIES *et al.*, 1997).

Uma das principais características da EAE é o rompimento da BHE e o acúmulo de fluidos plasmáticos, levando ao surgimento de edema (CLAUDIO *et al.*, 1995). Estudos realizados na EAE demonstram que linfócitos T ativados cruzam a BHE. Ao infiltrarem-se no parênquima cerebral, interagem com as células da glia e iniciam desta forma, resposta inflamatória (TRAN *et al.*, 1998).

Os eventos que levam à quebra da BHE consistem da ativação de macrófagos e células T após a ligação com a ICAM-1, presente no endotélio cerebral, resultando na

produção de moléculas inflamatórias como IFN- γ , IL-1 e NO que, posteriormente, levam à alteração das propriedades da BHE (MERRIL & MURPHY, 1997).

Inicialmente, o linfócito se liga fracamente à parede do endotélio ao encontrar fatores de ativação específicos, isto é, ocorre a interação do LFA-1, presente na membrana celular dos linfócitos, com as moléculas de adesão celular ICAM-1/ICAM-2 localizadas na membrana das células endoteliais. Sequencialmente, aumentando a força de ligação, ocorre a interação do VLA-4 com a VCAM-1, presentes nas membranas celulares dos linfócitos e das células endoteliais respectivamente. Pelo estímulo de sinais quimiotáticos, independente de sua especificidade antigênica, os linfócitos T CD4+ atravessam o endotélio por diapedese através das junções do tipo "tight", cuja integridade foi afetada e a seguir através da membrana basal do capilar (HARTUNG *et al.*, 1995; MILLER & SHEVACH, 1998).

Ocorre a seguir a interação antígeno-específica dos linfócitos CD4+ com uma célula apresentadora de antígeno MHC classe II, como células da micróglia perivascular, micróglia e possivelmente astrócitos. A expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular aumentam e citocinas quimiotáticas e pró-inflamatórias são liberadas (WEKERLE *et al.*, 1994; GERHMANN *et al.*, 1995).

As células endoteliais da BHE expressam as mesmas moléculas de adesão para leucócitos encontradas em outros endotélios, as quais são utilizadas para direcionar os linfócitos para o parênquima do SNC que mesmo sob circunstâncias normais, há circulação de células mononucleares (HART & FABRY, 1995; ENGELHARDT, 1997).

1.2. Células da Glia

As micróglias constituem um grupo heterogêneo de células, encontradas nas substâncias cinzenta e branca. Em condições normais, sua morfologia é variável, mas em repouso apresentam-se altamente ramificada e com núcleo alongado, correspondem a 20% das células gliais no SNC. Estas células são relacionadas com a linhagem de monócitos/macrófagos e, por essa razão, também expressam moléculas do MHC classe II (BAUER *et al.*, 1994).

Após a indução da EAE, durante a fase efetora, as micróglias proliferam tornando-se hipertróficas. Ao mesmo tempo, linfócitos T encefalitogênicos recrutam os macrófagos do sangue periférico para os sítios de lesão (HUITINGA *et al.*, 1995).

Uma vez ativadas, as micróglias sofrem mudanças morfológicas retraindo suas ramificações, assemelhando-se a um macrófago e, mudanças funcionais, que compreendem o aumento da expressão dos antígenos do Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC) e a liberação de substâncias mediadoras já mencionadas, ou seja, moléculas citotóxicas, intermediários reativos de oxigênio, óxido nítrico, proteases e citocinas inflamatórias (GEHRMANN *et al.*, 1995).

Os macrófagos e as micróglias são responsáveis pelos processos desmielinizantes característicos da EAE e da EM, devido à atividade fagocítica destas células (BAUER *et al.*, 1994). O ataque do sistema imune é direcionado para as células responsáveis pela formação da mielina, os oligodendrócitos (BOCACCI & STEINMAN, 1996).

A função básica do oligodendrócito é a formação e, juntamente com os astrócitos, a manutenção da mielina, participando também da manutenção do microambiente próximo aos neurônios e, desta forma, atuando no crescimento e manutenção do axônio (LUDWIN, 1997).

As principais proteínas da mielina (figura 1) são a MBP e a PLP, mas há também a MAG e a MOG. É provável que a MBP, esteja associada à face citoplasmática da membrana, mediando a compactação entre duas superfícies citoplasmáticas adjacentes. O PLP é uma proteína integral de membrana, sendo sua função hipotética, a de mediar a interação entre duas superfícies extracelulares opostas. A MAG, molécula de adesão celular, atua na manutenção da estrutura periaxonal normal. Juntamente com a MOG constituem os principais antígenos encefalitogênicos que desencadeiam os processos autoimunes observados na EAE (PFEIFFER *et al.*, 1993; BEVENISTE, 1997; LUDIWIN, 1997; LI *et al.*, 1998).

Embora os macrófagos e as micróglia sejam considerados mediadores do processo inflamatório, alguns autores verificaram que a presença de macrófagos em culturas de tecido nervoso central induz o aumento da produção de MBP, PLP e MAG. Estes dados sugerem que os macrófagos seriam também importantes no processo de remielinização, por liberarem *in vitro*, fatores moduladores da proliferação, diferenciação e sobrevivência de oligodendrócitos (AMOR *et al.*, 1997).

Estudos *in vitro* demonstraram que as micróglia são capazes de expressar fator de crescimento neural (NGF), o qual atua no crescimento, sobrevivência e

maturação neuronal. Expressam também o fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF) e o fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), que estimulam a proliferação de células progenitoras do oligodendrócito (PFEIFFER, *et al.*, 1993).

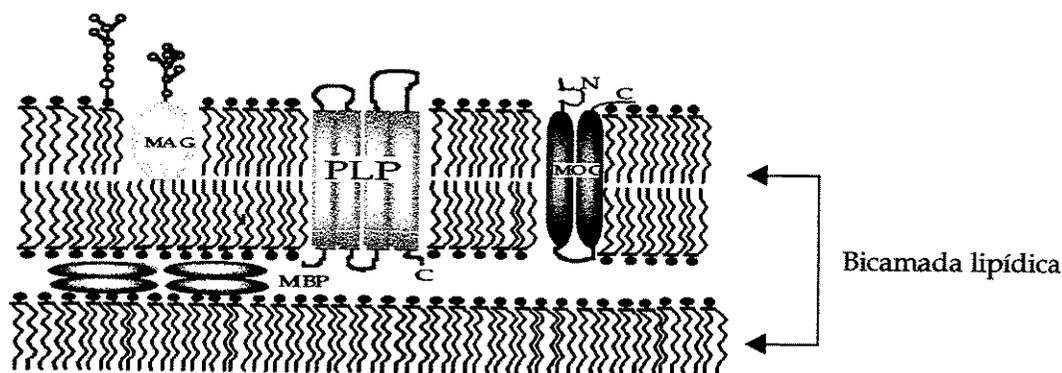


Figura 1. Representação esquemática das principais proteínas da mielina. A associação com a Membrana de mielina é hipotética (modificado de Pfeiffer *et al.*, 1993). N= amino-terminal C=carboxi-terminal

Os astrócitos são caracterizados por uma grande quantidade de prolongamentos citoplasmáticos, podem ocorrer tanto na substância cinzenta como na branca. Classicamente são divididos nos tipos protoplasmáticos e fibrosos. Entre as várias funções estão envolvidos no suporte estrutural para o tecido nervoso e atuam na transmissão sináptica (DEGROOT, 1991).

Astrócitos também participam dos eventos imunológicos ocorridos no SNC durante em doenças como a EM e a EAE, uma vez que podem ser induzidos a atuar de forma análoga aos macrófagos e células da micrógliia, tornando-se células imunocompetentes. Estas células possuem a capacidade de responder ou secretar citocinas imunorregulatórias como a IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, fatores estimulantes de colônia (CSFs), IFN- γ , TGF- β , TNF- α e quimioquinas (BEVENISTE, 1997).

Os astrócitos podem ainda expressar os antígenos MHC classe II após exposição ao IFN- γ , bem como aumentar tal expressão na presença do TNF- α . Isto faz crer que estas citocinas regulam a capacidade do astrócito para atuar como uma célula apresentadora de antígeno no SNC (CHUNG *et al.*, 1991).

Após a instalação da lesão ocorre a ativação dos astrócitos, dando origem à gliose reativa, caracterizada pela hipertrofia e hiperplasia dessas células, com aumento da expressão da proteína fibrilar glial astrocítica (GFAP) (BEVENISTE, 1997).

Na EAE observa-se a presença de astrócitos reativos no pico da doença, com posterior formação da cicatriz glial ao final dos sinais clínicos (MATSUMOTO *et al.*, 1992).

1.3. Linfócitos T CD4+ Th1, Th2, Th3 e Citocinas

Está estabelecido que sob estímulo antigênico, linfócitos T CD4+ podem diferenciar-se nos sub-tipos Th1, Th2 ou Th3, dependendo do tipo de citocinas secretada (revisto por OLSSON, 1995; DAS, 1997). As células Th1 atuam principalmente em reações de hipersensibilidade do tipo tardia, imunidade celular e viral, produzindo IL-2, linfotoxina, TNF- α e IFN- γ . As células Th2 estão envolvidas na proliferação e diferenciação de linfócitos B, participam na defesa contra parasitas e em processos alérgicos, produzindo IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 (OLSSON, 1995). Já as células Th3 consistem de uma linhagem distinta de linfócitos T, as quais secretam TGF- β (HAFLER *et al.*, 1997).

Através da técnica de hibridização *in situ*, foi demonstrado que muitas células não podem ser classificadas como Th1, Th2 ou Th3, por exibirem um padrão complexo e heterogêneo de citocinas, com a combinação de IL-2, IL-4, IL-5, IFN- γ e IL-10 e TGF- β . Este tipo de células tem sido chamado de Th0 (ABBAS *et al.*, 1996).

As citocinas constituem um grupo de proteínas de 8-26 kDa, produzidas por uma grande variedade de células. Produzidas durante a fase efetora da imunidade, as citocinas medeiam e regulam as respostas inflamatórias. Após a transcrição genética, o RNAm transcrito é normalmente instável e a citocina é rapidamente liberada (BEVENISTE, 1997).

Normalmente iniciam sua ação localmente pela ligação à receptores específicos na superfície celular. Esta ligação ativa sistemas de segundos-mensageiros intracelulares, que posteriormente desencadeiam respostas na célula-alvo via proteinaquinasas ou fosfatases (ZHAO & SCHWARTZ, 1998).

As citocinas têm função crucial no processo lesivo, atuando no início, propagação e regulação da lesão autoimune tecido-específica. As citocinas do tipo Th1 estão presentes nas lesões inflamatórias da EAE no SNC. Já as citocinas expressas pelas células Th2 e Th3, estão associados à fase de recuperação da EAE (KUCHROO & WEINER, 1998).

O estudo da EAE monofásica aguda em ratos Lewis, demonstrou que o aparecimento das citocinas é seqüencial. Inicialmente ocorre a produção de IL-12 pelas APCs, o que coincide com o aparecimento das primeiras células inflamatórias, antes

do início dos sinais clínicos. Esta citocina promove a diferenciação das células Th1, que expressam IFN- γ , TNF- α e/ou LT- α . Posteriormente, na fase aguda da doença e paralelamente ao aumento da gravidade dos sinais clínicos, também são expressas IFN- γ e TNF- α . Estas citocinas irão desencadear a doença por lesão direta aos oligodendrócitos e à mielina, bem como pela ativação de macrófagos, que estão envolvidos na desmielinização. Durante a fase de recuperação da EAE ocorre o aumento da expressão das citocinas das células Th2, que secretam IL-4, IL-10 e IL-13 e atuam como desativadores de macrófagos. Além disso, há expressão do TGF- β , produzido por células Th2/Th3. A expressão de IL-4 não tem relação clara com a sequência dos eventos patológicos (OLSSON, 1995; NAVIKAS & LINK, 1996).

1.3.1 Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α)

O TNF- α foi originalmente identificado como mediador de necrose tumoral encontrado no soro de animais tratados com LPS. Esta citocina é inicialmente sintetizada como uma proteína transmembrana não glicosilada. O fragmento de 17 kDa, incluindo a porção carboxi-terminal é então clivada da membrana plasmática produzindo a forma secretada, a qual circula como homotrímero de aproximadamente 51 kDa (ABBAS *et al.*, 1994).

O TNF- α é uma das principais citocinas envolvidas na patogênese da EAE. Seu RNAm tem sido detectado nas lesões da EM, e sua síntese aumenta na fase aguda, junto com o agravamento dos sinais clínicos na EAE. Embora seja produzida

principalmente por macrófagos e linfócitos T ativados, outros tipos celulares como as micróglias e os astrócitos também podem expressá-lo (BEGOLKA & MILLER, 1998).

Os efeitos biológicos do TNF- α incluem a quebra das junções do tipo "tight", o aumento da expressão de moléculas de adesão como ICAM-1 e VCAM-1, do MHC classe II em astrócitos e a destruição de oligodendrócitos (NAVIKAS & LINK, 1996; KÖRNER *et al.*, 1997).

Em estudos realizados com pacientes portadores da EM, verificou-se que o número de células expressando RNAm do TNF- α no sangue periférico era diretamente proporcional ao estado de exacerbação da doença e ao grau de incapacidade do paciente. Esse número também era maior em pacientes cuja incapacidade era grave, quando comparado com aqueles que apresentavam incapacidade amena (RIECKMANN *et al.*, 1994; OLSSON, 1995; MARTINO *et al.*, 1998).

Por outro lado, animais com deleção do gene para o TNF- α , desenvolvem a EAE normalmente, indicando que a redundância funcional das citocinas pró-inflamatórias, como o que ocorre entre o IFN- γ e o TNF- α . Desta forma na falta do TNF- α , é provável que haja a compensação pelo IFN- γ na gênese da doença (SELMAJ *et al.*, 1998). Estes estudos demonstraram que a constituição do infiltrado perivascular é alterado, propondo a importância desta citocina para o estabelecimento da lesão na EAE (BEGOLKA & MILLER, 1998).

1.3.2. Fator Transformador de Crescimento β (TGF- β)

O TGF- β constitui uma família de moléculas codificadas por diferentes genes denominados TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3, além de outros membros que estão envolvidos no desenvolvimento. Células do sistema imune como os linfócitos T e os monócitos sintetizam principalmente TGF- β 1, mas o SNC pode apresentar altos níveis de TGF- β 3 (ABBAS *et al.*, 1994).

Em 1989 foi descrito pela primeira vez *in vitro*, a ação do TGF- β na inibição da ativação de linfócitos T MBP-específicos, interferindo desta forma com a indução da EAE por transferência adotiva. Subseqüentemente, muitos laboratórios confirmaram que o TGF- β é efetivo tanto na prevenção como na reversão dos sinais clínicos. Além disso, anticorpos neutralizantes contra o TGF- β aumentam a gravidade da EAE, indicando que esta citocina tem importante papel na melhora da doença autoimune (SMELTZ *et al.*, 1998).

O TGF- β pode exercer suas propriedades imunossupressoras por regular a produção de outras citocinas. Por exemplo, o TGF- β inibe a produção de IFN- γ em células mononucleares de sangue humano ativadas por mitógeno e, podendo atuar desta forma, diretamente sobre as células Th1. O TGF- β também suprime a apresentação de auto-antígenos por astrócitos e antagoniza a expressão do MHC classe II induzido pelo IFN- γ e TNF- α , em ratos. A expressão do RNAm do TGF- β na medula espinhal aumenta durante o período que precede a fase de recuperação da EAE. Além disso, em surtos prolongados da EAE, verifica-se a ausência do RNAm do

TGF- β na medula espinhal de ratos da linhagem DA, o que fornece uma possível explicação para a natureza do surto da doença (NAVIKAS & LINK, 1996; LETTERIO & ROBERTS, 1998 ; SMELTZ & SWANBORG, 1998).

O endotélio cerebral pode sofrer ação direta do TGF- β , quando utilizado em tratamento de camundongos do 5º ao 9º dia após a indução da EAE, evita a infiltração de linfócitos T no SNC. Esses estudos realizados no endotélio cerebral sugerem que o TGF- β inibe a ativação destas células induzida pelo IFN- γ , impedindo a expressão dos produtos do gene MHC classe II e moléculas de adesão. (SMELTZ & SWANBORG, 1998).

Durante o curso da EAE induzida de forma ativa no modelo com ratos Lewis, tem sido demonstrado que a recuperação espontânea está associada ao aumento na ativação dos linfócitos T CD4+ antígenos-específicos, V β 8 capazes de secretar TGF- β . (BEGOLKA E MILLER, 1998).

O estudo dos mecanismos supressores do TGF- β tem levado à identificação de células que liberam esta citocina em animais que não respondem à indução da EAE quando tolerizados oralmente com a MBP. Contudo, a anergia clonal, isto é, a inativação funcional de células reativas à MBP, também pode ser responsabilizada como um dos mecanismos envolvidos na resistência à indução da EAE (SMELTZ & SWANBORG, 1998).

Na tolerância oral, células T das placas de Peyer de animais tratados com MBP por via oral, quando estimuladas com este tolerógeno *in vitro*, secretam TGF- β .

Além disso, estas células quando transferidas “adotivamente” conferem resistência contra a EAE. Pesquisadores demonstraram que os linfócitos responsáveis pela secreção do TGF- β são aqueles que induzem a supressão *in vivo* (SANTOS *et al.*, 1994). Além disso, a função protetora conferida por linfócitos T supressores CD4⁺ e CD8⁺ contra a EAE *in vitro* e *in vivo*, pode ser bloqueada por anticorpos neutralizantes anti-TGF- β (LETTERIO & ROBERTS, 1998).

Mais evidências da função fisiológica imunossupressora para o TGF- β *in vivo* têm sido fornecidas por estudos em camundongos cujo genes para TGF- β foram deletados. Verificou-se que tais animais morrem precocemente em virtude de inflamação, localizada principalmente no coração e no pulmão (KIEFER *et al.*, 1998).

1.4. Gangliosídeos

Junto a uma variedade de terapias imunes tem sido proposto o uso de gangliosídeos na redução das conseqüências deletérias de várias doenças neurodegenerativas e de origem autoimune (BRINKMAN *et al.*, 1983; OFFNER & VANDERBARK, 1985; MASSA, 1993; SHIMADA *et al.*, 1993; FERRARI *et al.*, 1995).

Os gangliosídeos constituem uma classe de glicoesfingolipídeos que possuem uma porção hidrofóbica, formada por um ácido graxo amido de esfingosina e uma cadeia hidrofílica de carboidratos, contendo uma ou mais moléculas de ácido siálico, o que lhes confere carga negativa. São mais abundantes nas células nervosas, onde representam 5-10% da massa lipídica total (ALBERTS *et al.*, 1995). Embora estejam primariamente localizados no folheto externo da membrana plasmática, também

ocorrem na sua forma livre no plasma sanguíneo e em outros fluidos corporais (BERGELSON, 1995).

Componentes importantes para diversos processos biológicos, os gangliosídeos participam da regulação do reconhecimento e adesão intercelular, proliferação, morfogênese, diferenciação, neuritogênese, apoptose e transformação oncogênica. Enquanto receptor e co-receptor de várias substâncias bioativas como hormônios e citocinas, atuam na tradução de sinais para o meio intracelular (BALLOW, 1992; MAHONEY & SCHNAAR, 1997).

Considerando os diferentes mecanismos pelos quais podem associar-se às células, a alteração do perfil dos gangliosídeos em um determinado tipo celular pode resultar na modulação das propriedades de superfície, atividade enzimática e função de outros tipos celulares. Sob esta abordagem, os gangliosídeos podem ser considerados como um tipo de citocina (BERGELSON, 1995).

Sabe-se que a concentração de gangliosídeos pode alcançar níveis elevados em algumas condições patológicas como o câncer e a arteriosclerose. Estas observações levaram à sugestão de que os gangliosídeos podem ser, pelo menos em parte, responsáveis pela alteração da imunidade observada em muitos pacientes com câncer, e por esta razão diversos estudos vêm sendo desenvolvidos para investigar seu uso terapêutico como agente imunossupressor (BERGELSON, 1995; IRANI *et al.*, 1995).

Os mecanismos moleculares de ação dos gangliosídeos não estão bem entendidos. Uma possibilidade seria que os gangliosídeos presentes nas superfícies

celulares liguem-se especificamente a receptores proteicos de células próximas, gerando a resposta apropriada. TIEMEYER e colaboradores (1990), trabalhando com o gangliosídeo GT1b, verificaram que seu receptor consiste de uma proteína carreadora transmembrana, à qual o gangliosídeo liga-se covalentemente através de sua porção lipídica. Os autores demonstraram ainda que estes receptores são encontrados na mielina do SNC, onde estariam posicionados para mediar interações entre os oligodendrócitos e os axônios a eles associados (TIEMEYER *et al.*, 1990).

Com relação à resposta imune, vários trabalhos têm demonstrado que os gangliosídeos suprimem a proliferação de leucócitos, por progenitores hematopoiéticos, a geração de linfócitos T citotóxicos (CTLs), a ativação e crescimento de linfócitos Th e a citotoxicidade de linfócitos "natural killer" (NK). Além disso, inibem a proliferação de linfócitos B, a produção de anticorpos, IL-1 e TNF- α por monócitos. Sabe-se ainda que suprimem a expressão do CD4 e a produção de IFN- γ em resposta à antígenos estranhos, ao mesmo tempo em que ativam linfócitos T com função supressora. Particularmente, esta atividade imunossupressora parece estar diretamente relacionada aos gangliosídeos GM3. Por outro lado, os efeitos inibitórios sobre a maioria das células T, aparentemente são mediados por gangliosídeos com porção glicídica mais complexa (KOIKE *et al.*, 1993; BERGELSON, 1995; IRANI *et al.*, 1995).

Em geral a supressão de linfócitos por gangliosídeos exógenos é observada *in vitro* em concentrações que variam entre 5-50nmol/ml⁻¹, concentrações estas correspondentes às encontradas no conteúdo sérico humano (BERGELSON, 1995).

Tem sido demonstrado que o gangliosídeo GD3 associado às células tumorais, em concentração extremamente baixa (0.2nmol ml^{-1}), estimulam significativamente a resposta humoral primária de células do baço depletado de linfócitos T, mas inibe a resposta em altas concentrações (BERGELSON, 1995). Verificou-se também que a ação do gangliosídeo sobre a resposta humoral é dependente de sua concentração, uma vez que altas doses podem inibir a blastogênese induzida por um antígeno, enquanto que baixas doses aumentam a resposta linfo-proliferativa (DOSMOROV *et al.*, 1997).

Os produtos dos genes MHC classe I e classe II são aparentemente regulados negativamente nas células de origem neuroectodérmica, em relação a outros tipos celulares, o que pode ser importante para a supressão de reações imunopatogênicas no SNC. Estes dados têm sido reiterados pela observação da expressão localizada das moléculas de MHC classe I e II em astrócitos nos casos de resposta inflamatória de linfócitos T, imunopatogênicas, como aquelas que ocorrem durante a formação da lesão ativa na EM e na EAE. Segundo MASSA (1993), os gangliosídeos suprimem especificamente a expressão do MHC classe I e II e ICAM-1, quando constitutiva ou induzida por IFN- γ em astrócitos. Esta atividade supressiva pode explicar a falta destas moléculas no SNC (MASSA, 1993).

YIM e colaboradores (1994) verificaram que a adição dos gangliosídeos GM3 e GD3 em cultura de células O-2A, progenitora dos oligodendrócitos, era capaz de induzir a formação de prolongamentos celulares e a expressão de componentes relacionados à mielina. Os autores concluíram que estes glicosíngolípides eram importantes para a diferenciação dos oligodendrócitos, uma vez que por serem

constituintes importantes da membrana plasmática, facilitariam a diferenciação celular para síntese de mielina. Por essa razão, os autores propuseram que as células da linhagem O2-A exibiam maior plasticidade, a qual seria promovida pelo GM3, durante os processos de desmielinização/remielinização, promovida pelo GM3 (YIM *et al.*, 1994).

Estudos experimentais e clínicos têm demonstrado que a administração de gangliosídeos após a lesão nervosa ter ocorrido, minimiza o dano e/ou promove a regeneração da área lesada. A capacidade dos gangliosídeos exógenos em promover a formação de neuritos tem sido abordada em vários protocolos e, em geral, estes efeitos não são específicos para um gangliosídeo em particular, mas podem ser causados por uma ampla variedade de lípidos contendo ácido siálico (YIM *et al.*, 1994).

Durante os processos de envelhecimento, há significativa diminuição da síntese do NGF. DUCHEMIN e colaboradores (1997), verificaram que a administração sistêmica de GM1 durante 30 dias, restaurava o conteúdo de NGF, aumentando os níveis de RNAm no córtex frontal e hipocampo de ratos velhos. Nestas regiões estão situados os terminais de neurônios colinérgicos do prosencéfalo, os quais necessitam do NGF para crescimento e sobrevivência (DUCHEMIN *et al.*, 1997).

Paradoxalmente, outros estudos têm abordado o possível envolvimento imunológico dos gangliosídeos como agentes causais em diversas neuropatologias. Anticorpos policlonais anti-gangliosídeos têm sido descritos em várias condições

neurológicas como esclerose amiotrófica lateral, EM e síndrome de Guillain-Barré (PONZIN *et al.*, 1991).

Auto-anticorpos direcionados contra gangliosídeos são frequentemente policlonais do isotipo IgM. Estes anticorpos são caracterizados pela ligação de baixa afinidade à porção glicídica da molécula do gangliosídeo. Por essa razão, a importância patogênica destes anticorpos não está clara (BANSAL *et al.*, 1994).

O GM1 é o gangliosídeo mais comumente reconhecido como antígeno, desencadeando a produção de anticorpos, tanto em condições normais como em condições patológicas. Na membrana celular dos neurônios e dos oligodendrócitos que formam a bainha de mielina existem grandes quantidades deste gangliosídeo. Desta forma, anticorpos anti-GM1 humanos não devem ser considerados como nocivos, visto que, embora sejam detectados por ensaio de fase sólida, sua afinidade faz com que este seja inadequado para desencadear a cascata de complemento, o que leva à conclusão de que anticorpos associados com estados patológicos devem ser anticorpos de alta afinidade (MIZUTAMARI, 1998).

Para avaliar seu potencial patogênico, SAEZ-TORRES e colaboradores (1998), induziram a EAE em animais da linhagens Lewis (ratos) e SJL (camundongos) utilizando gangliosídeos exógenos na preparação do inóculo. Seus resultados demonstraram que em nenhum animal houve a ocorrência da doença provocada pela imunização de gangliosídeos exógenos juntamente com o adjuvante, sem a presença da GP-MBP. Além disso, a titulação dos níveis de anticorpos anti-gangliosídeos

demonstrou que mesmo os animais que receberam o inóculo sem a presença de gangliosídeos (GP-MBP +CFA), apresentaram pequenas quantidades de anticorpos anti-gangliosídeos. Este fato é explicado como resultante da exposição dos gangliosídeos presentes nas membranas plasmáticas das células do SNC, após a quebra da BHE e ocorrência da lesão, o que pode representar um fenômeno secundário conforme postulado para a EM. Os autores concluíram que estes anticorpos provavelmente não exerçam função patológica na EAE, uma vez que nenhum sinal clínico ou histopatológico foi detectado nos animais com anticorpos anti-gangliosídeos (SAEZ-TORREZ, 1998).

A mistura de gangliosídeos bovinos purificados, administrados em doses de aproximadamente 100mg/dia, por períodos acima de um ano tem sido usada de forma terapêutica na Europa e em outras partes do mundo. Em virtude dos resultados obtidos em estudos realizados, acredita-se que estes glicoesfingolípides não são antigênicos e portanto, não desencadeiam efeitos colaterais imuno-mediados (ASBURY, *et al.*, 1994).

Com relação à administração destes gangliosídeos *in vivo*, independente da via de administração, foi demonstrado que sua meia-vida sérica é curta, entre 1:15h a 1:50h. Sendo que, quantidade significativa de gangliosídeos exógenos é encontrada no SNC e, provavelmente, por suas características anfífilas, consigam transpor a BHE, colaborando para os efeitos terapêuticos descritos (DUMONTET *et al.*, 1992).

Estudos farmacológicos realizados com a administração intramuscular, intraperitoneal e subcutânea de ³H-gangliosídeos, demonstraram que estes se distribuem através do organismo e atravessam a BHE em quantidades suficientes para exercer seus efeitos. Esta radioatividade persiste no cérebro por aproximadamente 48 horas após a administração. Além disso, com a quebra da BHE, como ocorre na EAE, a penetração do gangliosídeo no parênquima cerebral pode ser facilitada (PEPEU *et al.*, 1994).

A administração *in vivo* dos gangliosídeos e seu uso terapêutico na EM têm sido pouco explorados. Entretanto, foi demonstrado que o tratamento com gangliosídeos pode evitar o aparecimento dos sinais clínicos na EAE (SHIMADA *et al.*, 1994; INOE *et al.*, 1996). Por outro lado, estes compostos podem promover a sobrevivência neuronal, melhorando a recuperação dos animais em vários modelos de lesão do SNC (FADEN, 1996).

Por essas razões, consideramos importante ampliar os conhecimentos sobre o efeito do tratamento com gangliosídeos na evolução da encefalomielite experimental autoimune, modelo experimental da EM.

2. Objetivos

- ◆ Analisar o efeito da administração de altas doses (100mg/kg) de gangliosídeos durante a fase efetora da EAE sobre a evolução dos sinais clínicos.
- ◆ Correlacionar os efeitos da administração de gangliosídeos com as alterações histopatológicas e a evolução clínica da EAE.
- ◆ Verificar a resposta proliferativa *in vitro* de linfócitos obtidos de animais com EAE tratados com gangliosídeos.
- ◆ Avaliar a produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias em animais com EAE tratados com gangliosídeos.

3. Materiais e Métodos

3.1. Animais e Indução da EAE

Foram utilizados ratos da linhagem Lewis, machos, adultos, com peso médio de 300g, adquiridos do Centro de Bioterismo da UNICAMP (Campinas/SP) e mantidos no biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica, sob condições controladas de temperatura, ventilação, luz e umidade, recebendo água e ração *ad libitum*.

Os animais foram imunizados através da administração subcutânea de emulsão com 50µg de GP-MBP (proteína básica de mielina de cobaia, purificada do tecido cerebral segundo método modificado de DEIBLER, *et al.*, 1972) em 100µl de PBS (0,1M - pH7.4) e 100µl de Adjuvante completo de Freund (CFA), suplementado com 300µg de *Micobacterium tuberculosis* (*Mt*) (Difco, Detroit-MI-USA).

3.2. Grupos Experimentais

Grupo 1 → Animais imunizados com CFA + *Mt* + GP-MBP

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
		8 animais																		
		4 animais																		

I= Indução ativa/S= Sacrificio

Grupo 2 → Animais imunizados com CFA + *Mt* + GP-MBP, tratados do 7º ao 15º d.p.i. (dias pós-inoculação) com PBS (0,1M - pH 7.4).

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
A	I	Tratamento com															S			
B	I	Placebo															S			

I= Indução ativa/S= Sacrificio

Grupo 3 → Animais imunizados com CFA + *Mt* + GP-MBP, recebendo 100mg/Kg da

mistura de gangliosídeos: GM1-monossialogangliosídeo 21%; GD1^a-dissialogangliosídeo 40%; GD1^b-dissialogangliosídeo 16%; GT1^b-trissialogangliosídeo 40%; (Sinaxial[®]- TRB-Pharma -São Paulo/SP), do 7^o ao 15^o d.p.i.

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
A	I	12 animais						Tratamento com Gangliosídeos												S
B	I	6 animais																		S

I= Indução ativa/S= Sacrifício

Animais Normais

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
A		3 animais																		S	
B		3 animais															S				

S= Sacrifício

3.3 Evolução Clínica

Os ratos foram pesados e examinados diariamente para verificação dos sinais clínicos da EAE, segundo escore: 0=sadio; 1=perda de tônus da cauda; 2=perda parcial de tônus dos membros posteriores e dificuldade de endireitamento; 3 = paralisia total dos membros posteriores e acometimento dos membros anteriores; 4=tetraplegia ou moribundo; 5 = morte.

3.4 Análise Morfológica

3.4.1. Sacrifício dos Grupos Experimentais e Obtenção dos Espécimes para Estudo Histológico

No 19^o dpi, os animais foram anestesiados (Pentobarbital, 50mg/Kg) e decapitados. A seguir, o encéfalo destes animais foi rapidamente removido e congelado pela imersão em nitrogênio líquido e conservados em freezer à -20°C.

Posteriormente, os espécimes foram submetidos à criotomia, obtendo-se cortes de 10µm de espessura coletados em lâminas silanizadas (3-Aminopropyltriethoxy-silane - Sigma - St. Louis - Mo - USA).

3.4.2. Identificação de Astrócitos Através de Imunoperoxidase

Para realização da técnica de imunoperoxidase, os cortes obtidos conforme protocolo anterior, foram fixados em paraformaldeído 2% em PBS(0.1M, pH7.4) durante 15 minutos. Após lavagem em PBS, foi realizada a permeabilização dos cortes do tecido com Triton X-100 (0,1% em PBS) por 10 minutos e novamente lavadas em PBS. Para inibição da peroxidase endógena os cortes foram incubados em peróxido de hidrogênio 1% (Sigma St. Louis - Mo - USA) diluído em metanol durante uma hora. Para o bloqueio de sítios inespecíficos os cortes foram incubados, em solução 0.1% de Tween 20 em PBS e leite desnatado em pó (5%) durante uma hora à temperatura ambiente. A seguir, os cortes foram incubados com anticorpo primário anti-proteína acídica fibrilar glial (GFAP) bovina, produzido em coelho, na proporção de 1:1000 (Dako A/S), diluído em PBS e acrescido de leite desnatado em pó 1%, por 12 horas a 4°C. Posteriormente, após lavagem, os cortes foram incubados em anti-IgG de coelho conjugado com biotina (Dako), durante o período de 2 horas. Finalmente, os cortes foram incubados em streptoavidina conjugada com peroxidase (Dako). Para revelação da reação foi utilizado 3,3'-diaminobenzidina (DAB - SIGMA- St. Louis - Mo - USA), diluída (600µg/ml) em TBS seguida à adição de peróxido de hidrogênio 0.01%. Os cortes foram contracorados com hematoxilina de Harris e submetidos à reação de

saponificação por carbonato de lítio. Após desidratação em série crescente de álcool, os cortes foram montados com Entelan (Merck - Darmstadt - Germany) e observados em microscópio de luz. Os preparados histológicos selecionados foram fotografados no Fotomicroscópio Carl-Zeiss/Jenaval, modelo JENALUMAR (Oberleöchen, Germany).

3.4.3. Detecção de Linfócitos CD4+ e CD8+

Para detecção de linfócitos CD4+ e CD8+ por imunofluorescência, os cortes obtidos conforme protocolo já descrito, foram fixados em paraformaldeído tamponado 2% durante 15 minutos, após lavagem em PBS (0.1M, pH7.4), foi realizada a permeabilização com Triton X-100 (0,1%) em PBS por 10 minutos e novamente lavados em PBS. Para o bloqueio de sítios inespecíficos os cortes foram incubados em Tween 20 (0,1% em PBS) e leite desnatado em pó (5%) durante uma hora em temperatura ambiente. A seguir, os cortes foram incubados nos anticorpos primários: anti-CD4 de rato produzido em camundongo na diluição de 1:10 (W3/25 - Serotec - Oxford - UK) e anti-CD8 de rato produzido em camundongo na diluição de 1:50 (OX8-Pharmingen - San Diego/CA - USA), diluído em PBS e acrescido de leite desnatado em pó 1%, por 12 horas, a 4°C. Posteriormente, os cortes foram incubados em anti-IgG de camundongo produzido em coelho (Sigma - St. Louis - Mo - USA), na diluição de 1:100 em PBS e acrescido de leite desnatado em pó 1%, durante de 2 horas. Finalmente, os cortes foram incubados em anti-IgG de coelho, produzido em cabra, conjugado com fluoresceína (Sigma - St. Louis - Mo - USA), na proporção de 1:100, diluído em PBS e acrescido de leite desnatado em pó 1%, durante duas horas, no

escuro. As lâminas foram então montadas com Vectashield (Vector - Burlingame -Ca - USA) e observadas em microscópio de luz equipado para fluorescência Nikon Eclipse E-800 (Japan), em comprimento de onda de 540nm.

3.4.4. Quantificação dos Infiltrados Inflamatórios

Os cortes utilizados para quantificação dos infiltrados inflamatórios, foram coradas com hematoxilina e eosina (HE). A densidade dos infiltrados inflamatórios foi determinada na região periventricular cerebral e no cerebelo (BERGER *et al.*, 1997). Com auxílio de um retículo morfométrico foi determinado o número de infiltrados em cada uma das regiões acima, pela contagem do número de infiltrados inflamatórios na área de três retículos por corte, perfazendo uma área total de 4.32mm² por corte.

3.5. Análise Imunológica

3.5.1. Obtenção de Células Mononucleares de Baço

Após a decapitação dos animais, o baço foi removido assepticamente e colocado em placa de Petri estéril, contendo meio RPMI 1640 (Sigma - St. Louis - Mo-USA). Para obtenção das células, os baços foram cuidadosamente macerados, utilizando pequenas peneiras estéreis. Após serem isoladas, as células foram colocadas em tubos de ensaio estéreis e lavadas por 3 vezes com solução salina de Hank's e centrifugadas por 10 minutos, a 1500 rpm. Após a primeira centrifugação o botão celular foi tratado com tampão de lise com o objetivo de eliminar os eritrócitos. A suspensão celular foi ressuspendida em meio RPMI 1640 enriquecido com soro fetal

bovino a 5% (Microbiológica/RJ), 2-mercaptoetanol (1:5000), glutamina 0.2M (1%) e 4.25 mg/ml de gentamicina. Para determinar a viabilidade celular foi usado o método de exclusão do corante Azul Trypan, o qual não penetra através da membrana plasmática das células viáveis. Após a contagem em câmara de Neubauer, a concentração de células foi ajustada para 2×10^6 células/ml.

3.5.2 Cultura de Células Mononucleares de Baço

As células do baço obtidas segundo protocolo acima, foram colocadas em placas para cultura com 96 poços (Costar Ma-USA) e cultivadas em meio RPMI 1640 enriquecido com soro fetal bovino 5% e 4.25mg/ml de gentamicina, 1% de glutamina 0.2M e 2-mercaptoetanol a 1:5000, em triplicata. Para avaliação da transformação blástica de linfócitos, estes foram estimulados com MBP (25 μ g/ml). As células foram incubadas por 72 horas com o antígeno, em incubadora contendo tensão constante de 5% de CO₂, a 37°C. As células obtidas dos animais dos grupos experimentais B (sacrifício 15ºdpi), foram incubadas ainda com a mistura de gangliosídeos para avaliação da influência deste composto. Aproximadamente 20 horas antes do término do período de incubação, cada poço recebeu 1 μ Ci de timidina tritiada (New England Nuclear Ma, USA). Após este período, o excesso de material radioativo foi retirado, lavando-se as células em um coletor (Cell Harvester modelo 200 A Cambridge Technology, Inc - Watertown - Ma - USA). As células livres de excesso radioativo foram depositadas em papel de fibra de vidro (Cambridge Tech - Watertown - Ma - USA) e embebidas em 2 ml de líquido de cintilação (PPO 2% em toluol). O conteúdo

radioativo foi determinado em cintilador beta (Beckman-Liquid Scintillation System, Fullerton - Ca - USA). Os resultados foram expressos em contagem por minuto (cpm), sendo considerada a média das triplicatas

3.5.3. Produção de TNF- α

As células mononucleares do baço foram colocadas em placas com 24 poços e estimuladas com GP-MBP (25 μ g/ml) e incubadas durante 24 horas. Após este período o conteúdo dos poços foi retirado, centrifugado e o sobrenadante armazenado em freezer a -20°C até a realização do ensaio biológico para dosagem do TNF- α .

O ensaio biológico para dosagem do TNF- α foi realizado com células WEHI (linhagem 164), gentilmente cedidas pelo Centro Integrado de Pesquisas Onco-Imunológicas - CEPOI - UNICAMP, sobre as quais esta citocina exerce efeitos citotóxicos. Desta forma, a quantificação é realizada pelo número de células sobreviventes após a incubação com sobrenadante de cultura de células do baço, que supostamente contenham o TNF- α .

Para a realização do ensaio biológico, foi utilizada a concentração de 4×10^4 células/poço e colocadas em placa de 96 poços (50 μ l/poço); adicionou-se 50 μ l do sobrenadante obtido da cultura de células mononucleares e incubou-se por 20 horas, mantidas em estufa com tensão constante de 5% de CO₂, a 37°C. Após este período, adicionou-se 10 μ l/poço de MTT (5mg/ml em PBS), incubando-se por 4 horas (5% CO₂, 37°C). A seguir cada poço recebeu 100 μ l de SDS (10%), contendo HCl 0,01N e

incubados durante 15 minutos (5% CO₂, 37°C). A leitura foi efetuada em leitor de ELISA, com comprimento de onda de 540 nm.

Para quantificação, junto com as amostras experimentais, células WEHI foram incubadas com diferentes concentrações de TNF- α recombinante de camundongo (Pharmingen – San Diego/CA – USA). A leitura da densidade óptica foi utilizada para montagem da curva padrão e comparada com aquela obtida a partir dos sobrenadantes das amostras. A medida do TNF- α foi realizada em triplicata de todas as amostras.

3.5.4. Produção de TGF- β

As células mononucleares do baço foram colocadas em placas com 24 poços e estimuladas com GP-MBP, numa concentração de 25 μ g/ml e incubados durante 72 horas. Após este período, o conteúdo dos poços foi retirado, centrifugado e o sobrenadante armazenado em freezer a -20°C até a realização da dosagem do TGF- β .

As dosagens do TGF- β foram realizadas por meio de ensaio biológico, empregando-se as células CCL64, as quais são sensíveis à esta citocina. Por esta razão, os valores obtidos correspondem ao número de células sobreviventes após incubação com sobrenadante de cultura celular, onde supostamente haja a presença do TGF- β .

Para a realização do ensaio biológico, foram utilizadas células numa concentração de 0.1 \times 10⁶ células/ml, mantidas em placas com 96 poços, em estufa com tensão constante de 5% de CO₂, a 37°C, até a formação do tapete celular. O sobrenadante obtido da cultura de células mononucleares (100 μ l) foi adicionado à

cultura de células CCL64 e incubado por 24 horas. Após este período as células foram marcadas com $1\mu\text{Ci}$ /poço de timidina tritiada e incubadas por 20 horas. Após este período, o excesso de material radioativo foi retirado, lavando-se as células em um coletor. As células livres de excesso radioativo foram depositadas em papel de fibra de vidro e embebidas em 2 ml de líquido de cintilação (PPO 2% em toluol). O conteúdo radioativo foi determinado em cintilador beta.

A curva padrão foi realizada utilizando-se para tal diversas concentrações de TGF- β recombinante de camundongo (Pharmingen - San Diego - Ca - USA), os valores obtidos em células por minuto (cpm), foram utilizados para quantificação. Os resultados foram expressos em contagem por minuto (cpm), sendo considerada a média das triplicatas.

3.6. Análise Estatística

A análise dos resultados obtidos na quantificação de infiltrados inflamatórios, produção do TNF- α e TGF- β foram avaliados através do teste de Kruskal-Wallis nos experimentos com $n \geq 5$ e Mann-Whitney, nos experimentos com $n \leq 5$, o nível de significância considerado foi de $p \leq 0.05$.

4. Resultados

Os experimentos foram conduzidos segundo dois protocolos: no Experimento A, os animais dos grupos 1A, 2A, e 3A foram imunizados, tratados do 7º ao 15ºdpi e sacrificados no 19º dpi, permitindo desta forma observar a evolução da doença. No Experimento B os animais dos grupos 1B, 2B, e 3B foram imunizados e tratados como no grupo anterior, porém foram sacrificados no 15º dpi.

4.1 Avaliação Clínica

As primeiras manifestações neurológicas da EAE ocorreram entre o 10º e o 11ºdpi, evoluindo rapidamente até alcançar seu ápice no 15º dpi. A partir de então, os animais iniciaram a fase recuperação da EAE e no 19º dpi encontravam-se sem qualquer indício da doença (figura 2a).

Os animais do grupo 1A, que receberam inóculo contendo GP-MBP, CFA e *Mt*, apresentaram escore clínico médio máximo de 2,7, com perda do tônus da cauda, paralisia total dos membros traseiros e paralisia acentuada dos membros anteriores. Alguns animais deste grupo chegaram a apresentar quadriplegia e morte.

Os animais do grupo 2A, que receberam inóculo contendo GP-MBP, CFA e *Mt*, do 7º ao 15ºdpi foram tratados com duas injeções diárias de placebo (PBS, 0.1M, pH 7.4). Apresentaram escore clínico máximo de 2,4, com perda de tônus da cauda, paralisia total dos membros posteriores e comprometimento moderado dos membros anteriores. Neste grupo, assim como no anterior, alguns animais apresentaram quadriplegia e morte. A comparação estatística não mostrou qualquer diferença significativa no escore clínico entre estes dois grupos.

No grupo 3A, os animais foram imunizados com GP-MBP, CFA e *Mt*. Receberam tratamento com duas injeções diárias da mistura de gangliosídeos do 7º ao 15º dpi. O escore clínico médio máximo destes animais foi de 1,3; o que representa a perda de tônus da cauda e comprometimento brando dos membros posteriores. O escore clínico foi significativamente menor ($p < 0.05$), se comparado aos demais grupos. Contudo, a interrupção do tratamento no 15º dpi levou ao agravamento do quadro clínico, observado no 17º dpi, e posterior recuperação no 18º e 19º dpi (figura 2a).

O peso corporal observado nos animais experimentais durante os primeiros dias após a administração do inóculo apresentou uma pequena diminuição. Tal redução também foi observada nos animais normais. Contudo, nos animais imunizados observou-se que a partir do 5º dpi a perda de peso, evoluiu de forma progressiva e mais acentuada até a data do sacrifício no 19º dpi (figura 2b). Por outro lado, nos animais normais observou-se um progressivo aumento de peso.

É interessante observar que nos animais imunizados a perda de peso continuou a ocorrer, mesmo durante a fase de recuperação (figura 2c).

O escore clínico dos grupos que compõem o Experimento B (sacrifício no 15º dpi), mostrou que o início da doença se deu no 11º dpi, evoluindo até atingir o auge na data do sacrifício, apresentando evolução clínica semelhante à observada no Experimento A (figura 3a).

O grupo 1B, inoculado com GP-MBP, CFA e *Mt*, apresentou os primeiros sinais clínicos no 11º dpi, com piora clínica progressiva até a data do sacrifício, quando

os animais deste grupo apresentaram escore clínico médio máximo de 3,2, com perda de tônus da cauda, paralisia total dos membros posteriores e paralisia severa dos membros anteriores.

O grupo 2B, inoculado com GP-MBP, CFA e *Mt*, tratado do 7º ao 15ºdpi com duas injeções diárias de placebo (PBS, 0.1M, pH 7.4), também apresentou início da doença no 11ºdpi, evoluindo o comprometimento neurológico até o 15ºdpi, quando o escore clínico médio máximo foi de 2,9, com perda de tônus da cauda, paralisia total dos membros posteriores e paralisia grave dos membros anteriores.

O grupo 3B, inoculado com GP-MBP, CFA e *Mt*, tratados do 7º ao 15ºdpi com duas injeções diárias da mistura de gangliosídeos apresentaram os primeiros sinais clínicos da EAE no 11ºdpi, progredindo até o 15ºdpi para o escore clínico médio máximo de 1,5, com perda de tônus da cauda e paralisia moderada dos membros posteriores.

Nos grupos 1B e 2B a evolução da doença foi semelhante, sendo que em ambos foi observado quadriplegia e morte dos animais (escores 4 e 5).

Por outro lado, o grupo 3B apresentou escore clínico significativamente menor ($p < 0.05$), sem que fosse observado entre os animais deste grupo escore clínico acima de 2 (perda de tônus da cauda e paralisia total de membros posteriores). O animal normal não apresentou qualquer alteração em seu quadro neurológico (figura 3a).

A variação de peso observada foi semelhante ao experimento anterior, com perda de peso iniciando-se logo nos primeiros dias após a inoculação e progredindo juntamente com os sinais clínicos (figura 3b).

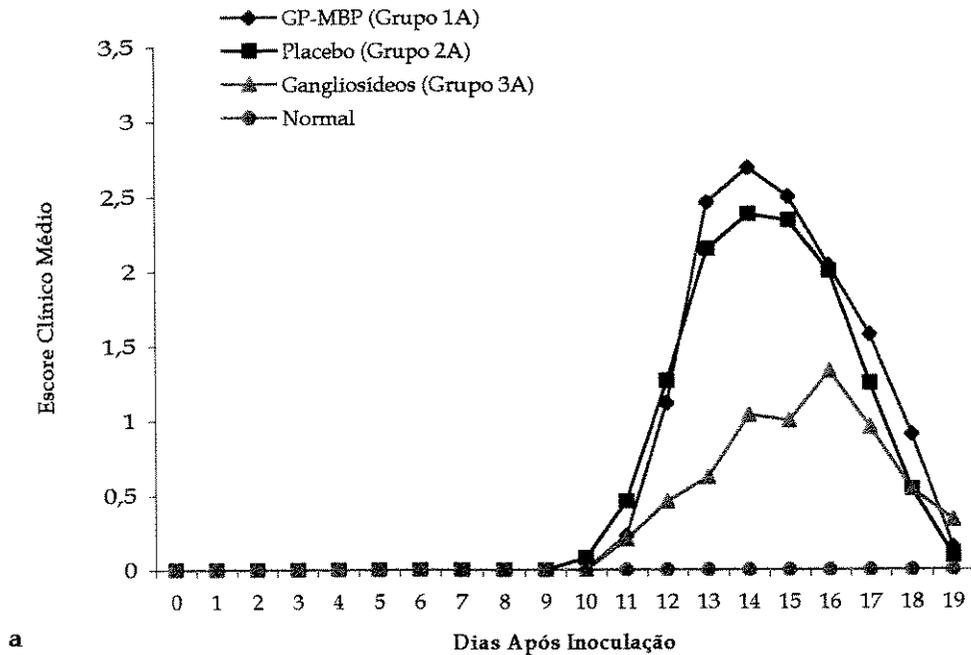
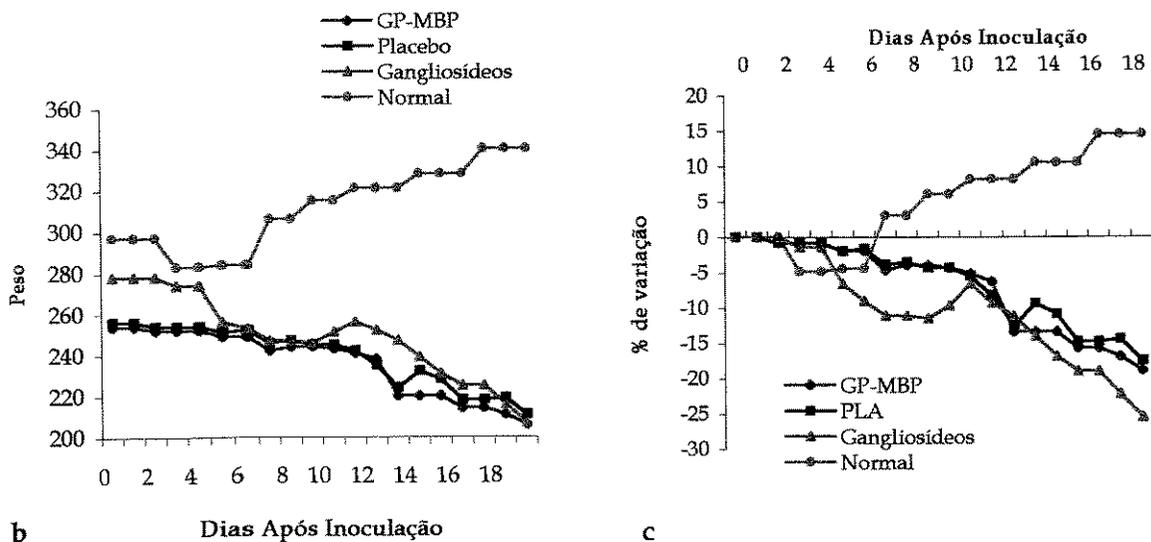


Figura 2a. Escore clínico médio dos animais sacrificados no 19º dpi. Os animais do grupo 1A (GP-MBP) e 2A (placebo) apresentaram sinais clínicos significativamente mais graves que os animais do grupo 3A (gangliosídeo). Observar que a suspensão do tratamento levou ao agravamento dos sinais clínicos (16º dpi) neste grupo, regredindo posteriormente ($p < 0,05$).



Figuras 2b e 2c. Gráficos da variação e porcentagem da perda de peso. 2b) A variação do peso mostra que em todos os grupos independente do tratamento e do escore clínico, o padrão de perda foi semelhante, com exceção do animal normal que recuperou seu peso. 2c) A porcentagem de perda de peso indica que os animais apresentaram queda acentuada após o 7º dpi, evoluindo progressivamente até a data do sacrifício.

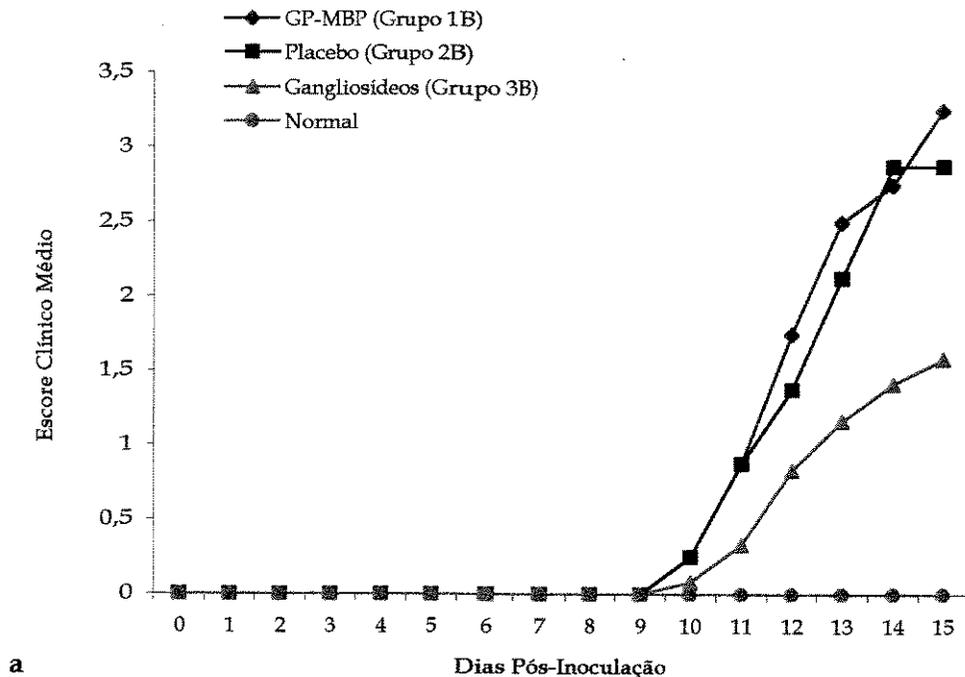
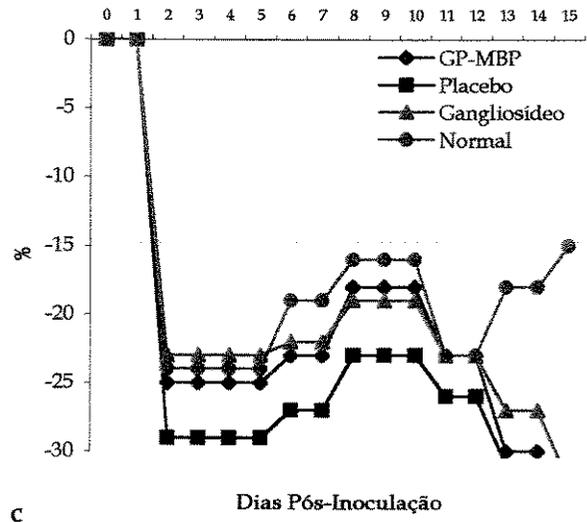
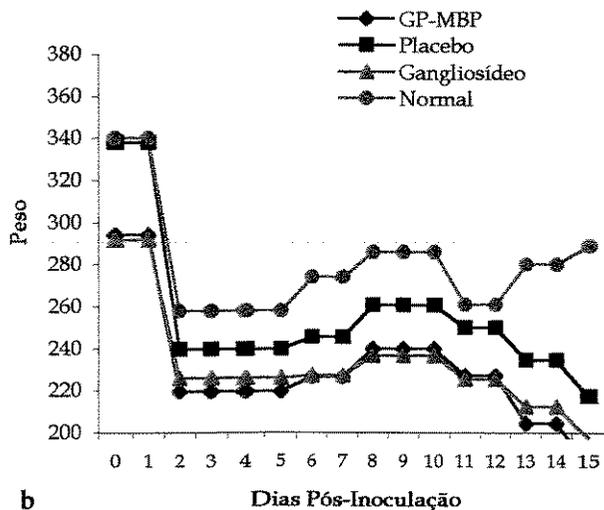


Figura 3a. Escore clínico médio dos animais sacrificados no 15ºdpi. Os animais deste grupo apresentaram o aparecimento dos sinais clínicos semelhante ao grupo anterior, alcançando o grau máximo na data do sacrifício. Os animais dos Grupos 1B (GP-MBP) e 2B (placebo) apresentaram evolução dos sinais de forma semelhante, enquanto que os animais do grupo 3B (gangliosídeos) apresentaram escore significativamente menor ($p < 0,05$).



Figuras 3b e 3c. Gráficos da variação e porcentagem da perda de peso. 3b) A variação do peso mostrou que os animais dos grupos 1B e 2B apresentaram brusca perda, com uma pequena recuperação no 8ºdpi, voltando a perder peso posteriormente até a data do sacrifício. 3c) A porcentagem de perda de peso demonstra comportamento muito semelhante entre todos os grupos, entretanto os animais do grupo 3B (gangliosídeo) apresentaram porcentagem ligeiramente menor de perda.

4.2 Análise Morfológica

4.2.1. Infiltrados Inflamatórios

A análise morfológica realizada nos animais do Experimento A, sacrificados no 19ºdpi, demonstrou que os infiltrados inflamatórios perivasculares ocorreram de forma difusa por todo encéfalo, sendo observados predominantemente em regiões periventriculares do cérebro (prancha 1-figura a). Por outro lado, no cerebelo os infiltrados inflamatórios foram encontrados igualmente por toda substância branca (prancha 1-figura b). O padrão destes infiltrados não mostrou-se alterado nos diferentes grupos experimentais, independente se tratado ou não.

A análise dos infiltrados inflamatórios mostrou a presença de células mononucleares, principalmente linfócitos (prancha 1-figuras c, d, e). Células com morfologia semelhante a macrófagos também foram encontrados, bem como células polimorfonucleares (prancha 1-figuras f, g).

4.2.2. Identificação de Astrócitos

A imunomarcação de astrócitos GFAP+ mostrou-se ligeiramente aumentada em locais próximos à ocorrência de infiltrados inflamatórios perivasculares (prancha 2 - figuras a, b, c, d). Pôde-se observar discreta marcação próxima aos vasos (seta), que correspondem aos pés vasculares dos astrócitos constituintes da BHE (prancha 2 - figura e). Não foram observadas diferenças na marcação entre os grupos experimentais.

4.2.3. Detecção de Linfócitos CD4+ e CD8+

A imunofluorescência para detecção da molécula de CD4 demonstrou a presença de linfócitos T CD4+ nos animais de todos os grupos, principalmente em infiltrados perivasculares. Neste caso, os linfócitos T CD4 mostraram ser os principais tipos celulares envolvidos nas lesões observadas, uma vez que sua marcação estava presente na maioria das células de todos infiltrados avaliados (prancha 3). É importante destacar que a imunomarcação observada nos animais do grupo tratado foi menos intensa, quando comparado ao demais grupos experimentais, (prancha 3- figuras c, d).

A imunofluorescência para detecção de linfócitos T CD8+ por outro lado, apresentou-se de forma mais difusa e discreta que a observada para linfócitos T CD4+. Além disso, a presença de linfócitos T CD8+ foi maior nas bordas da lesão e, eventualmente, encontravam-se em regiões fora do infiltrado. O padrão de imunomarcação dos linfócitos CD8+ não apresentou diferença entre os grupos controle (1A e 2A) e tratado com gangliosídeo (3A). Os animais normais não apresentaram imunomarcação para linfócitos T CD4 ou T CD8 (prancha 4).

4.2.3. Quantificação

O número de infiltrados inflamatórios na região periventricular do cérebro de animais do grupo 1A (GP-MBP), apresentou uma média de 1.2 infiltrados/mm², ao passo que no cerebelo a média foi de 1.6 infiltrados/mm².

Os cérebros dos animais do grupo 2A (placebo) apresentaram em média 1 infiltrado/mm² no cérebro e 1.2 infiltrados/mm² no cerebelo. Os animais do grupo 3A (gangliosídeos) apresentaram em média 0.6 infiltrado/mm² no cérebro e 1.1 infiltrados/mm² no cerebelo.

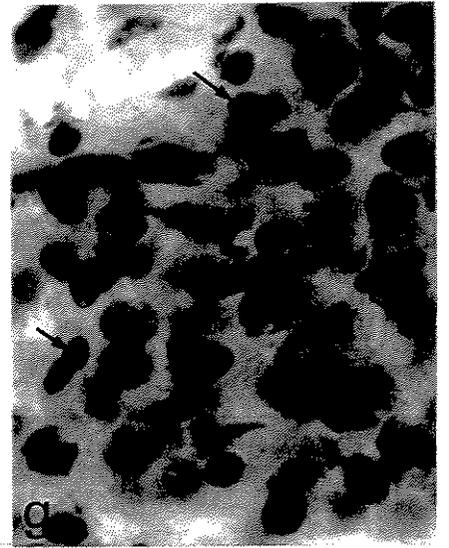
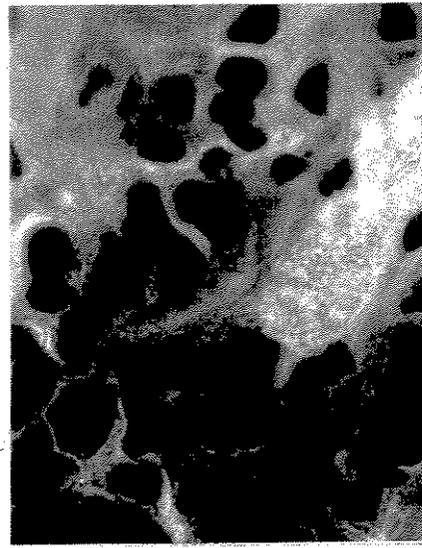
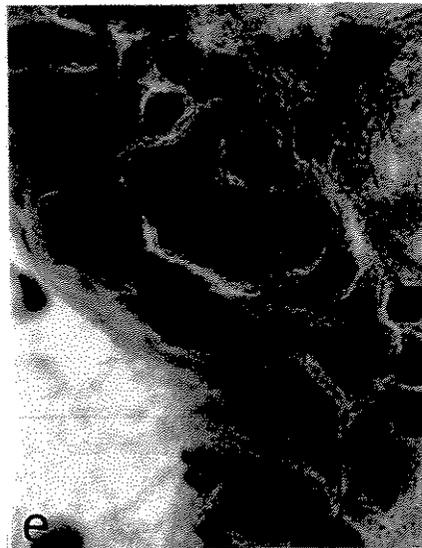
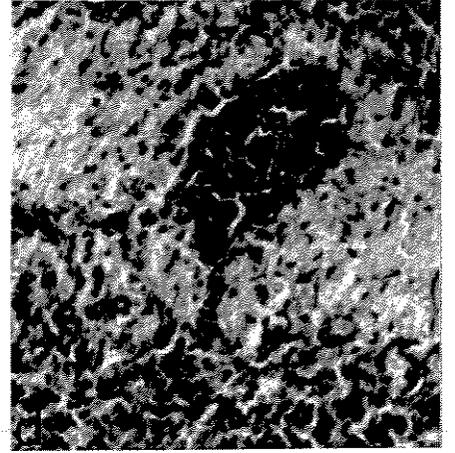
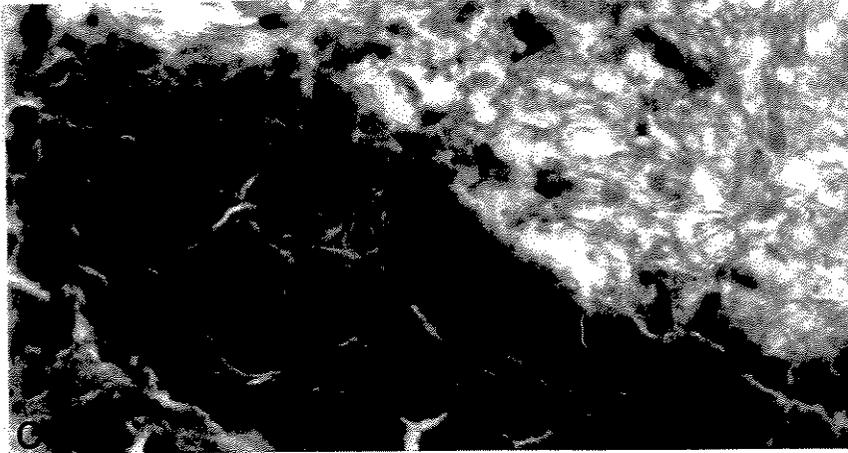
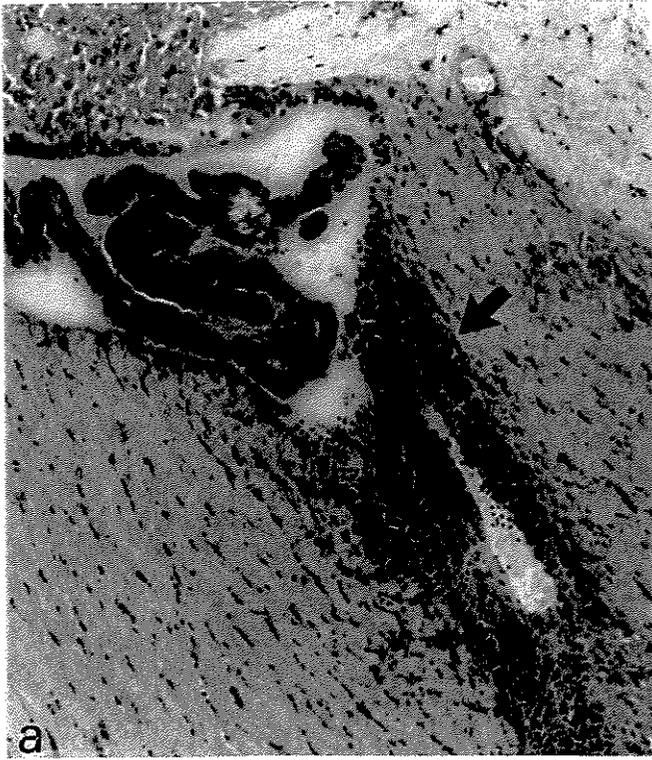
Estes dados, mostram que não houve diferença no número de infiltrados inflamatórios nos grupos GP-MBP e placebo. Por outro lado, a presença dos infiltrados inflamatórios nos animais tratados com gangliosídeos foi significativamente menor ($p < 0.05$) no cérebro (figura 4). Porém, a quantificação realizada no cerebelo, não evidenciou diferenças significativas entre os grupos experimentais.

Prancha 1. Fotomicrografias de cortes do tecido nervoso, coradas com hematoxilina e eosina.

Figuras a e b - Distribuição dos infiltrados inflamatórios. Animal portador da EAE, sacrificado no 19ºdpi. Em a região periventricular, onde observa-se presença de infiltrado inflamatório denso (seta). (50x). Em b cerebelo, onde podem ser observados diversos infiltrados inflamatórios (seta) distribuídos pela substância branca (25x).

Figuras c e d - Infiltrados Inflamatórios. Em c, o maior aumento revela a presença principalmente de linfócitos caracterizados por células, com citoplasma escasso e núcleo esférico (seta) (320x). Em d, observa-se que embora os infiltrados ocorram predominantemente na substância branca, eventualmente estes podem se difundir pela substância cinzenta (1000x).

Figuras e, f e g - Detalhe de regiões com infiltrados inflamatórios. Em e, observar detalhe de infiltrado com a presença de linfócitos (seta). Em f, pode-se verificar a presença de células com morfologia semelhante a macrófagos (cabeça de seta). Em g, eventuais polimorfonucleares (seta) podem ser detectados nas proximidades da lesão (1150x).

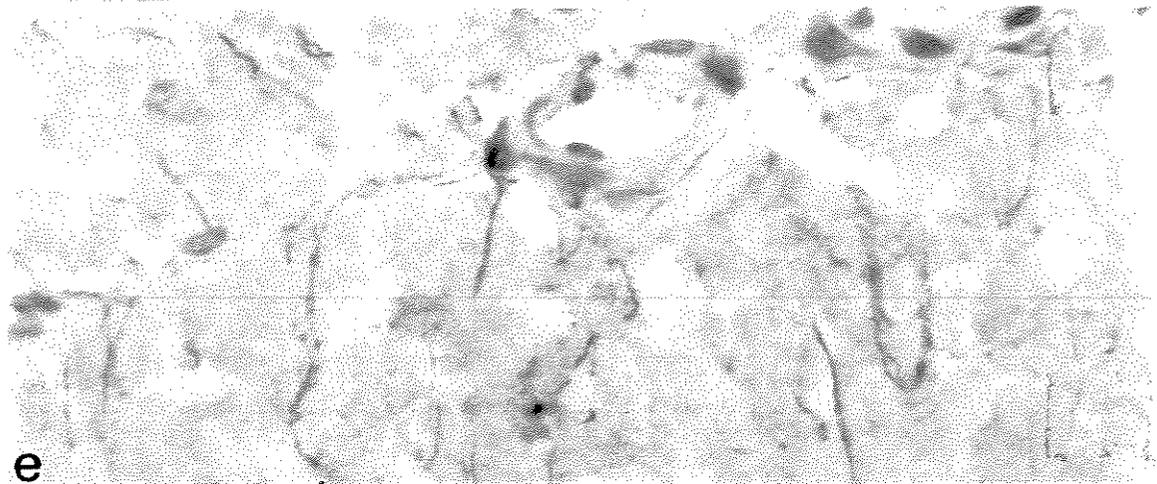
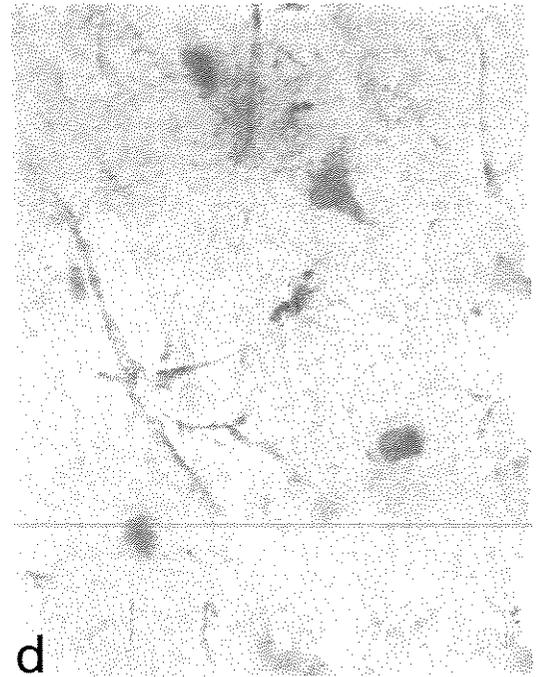
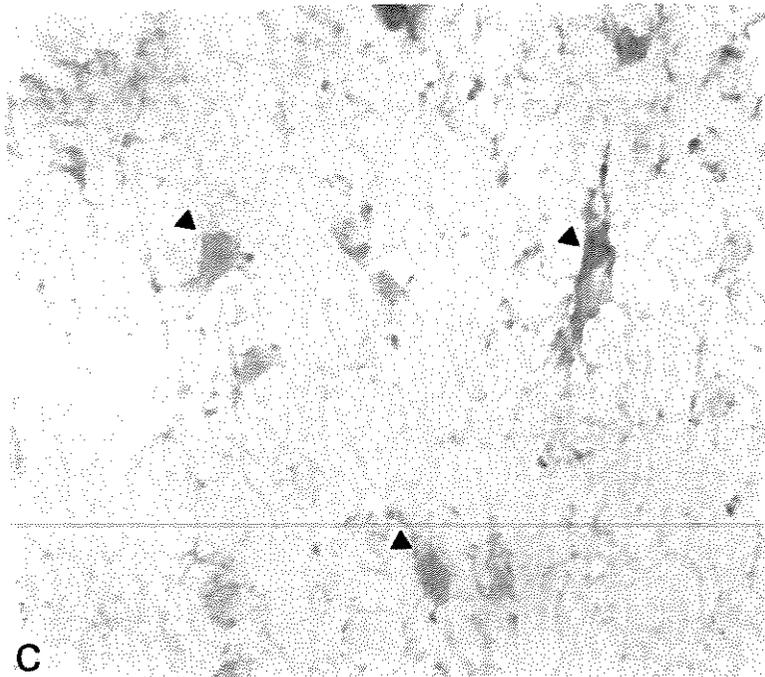
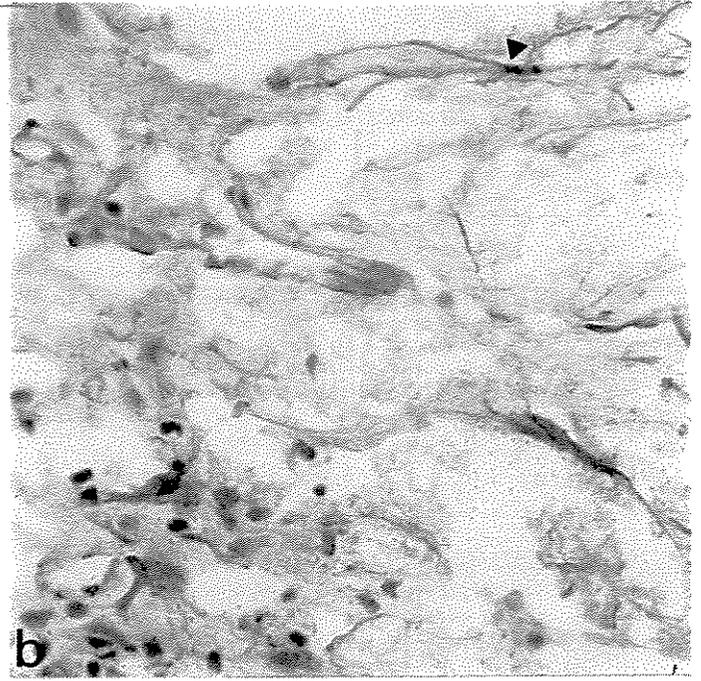
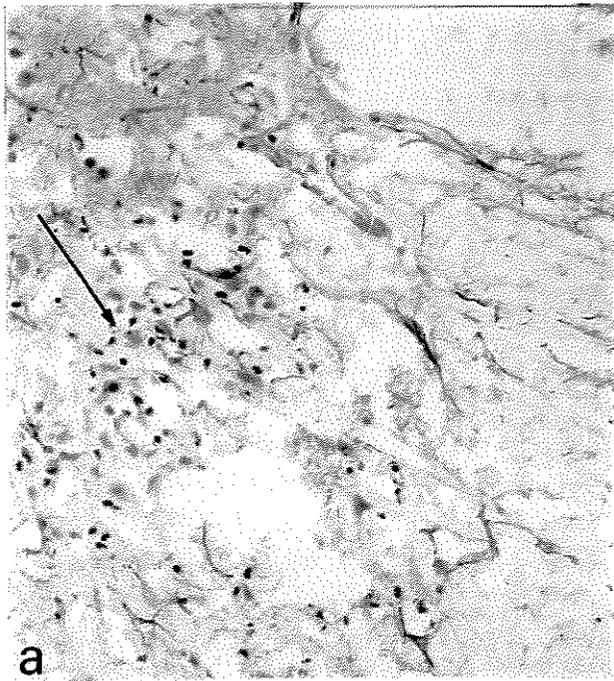


Prancha 2. Fotomicrografias de cortes obtidos por congelação onde foi realizada imunomarcção para detecção de GFAP em animais sacrificados no 19ºdpi.

Figuras a e b - Em a, corte de cerebelo onde observa-se infiltrado (seta), e várias células GFAP⁺ próximas a este (290x). Em b, maior aumento da figura a, onde pode ser observado um astrócito fibroso GFAP⁺ (cabeça de seta), característico da substância branca (580x).

Figuras c e d - Astrócitos imunomarcados encontrados próximo de infiltrado inflamatório, porém com marcação discreta.

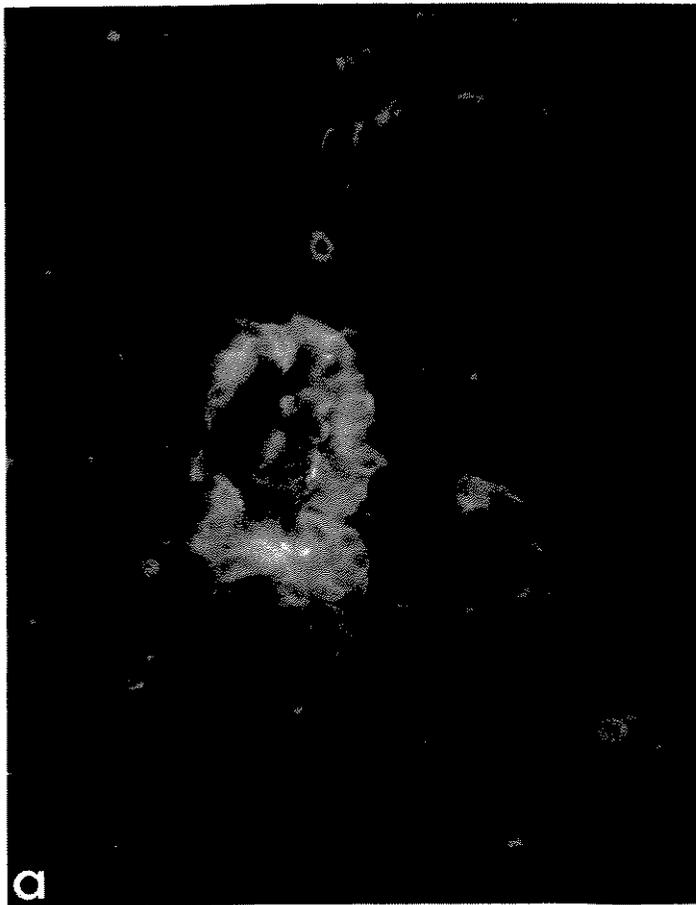
Figura e - Arteriola apresentando discreta marcação correspondente aos pés vasculares dos astrócitos, constituintes da BHE (1150x).



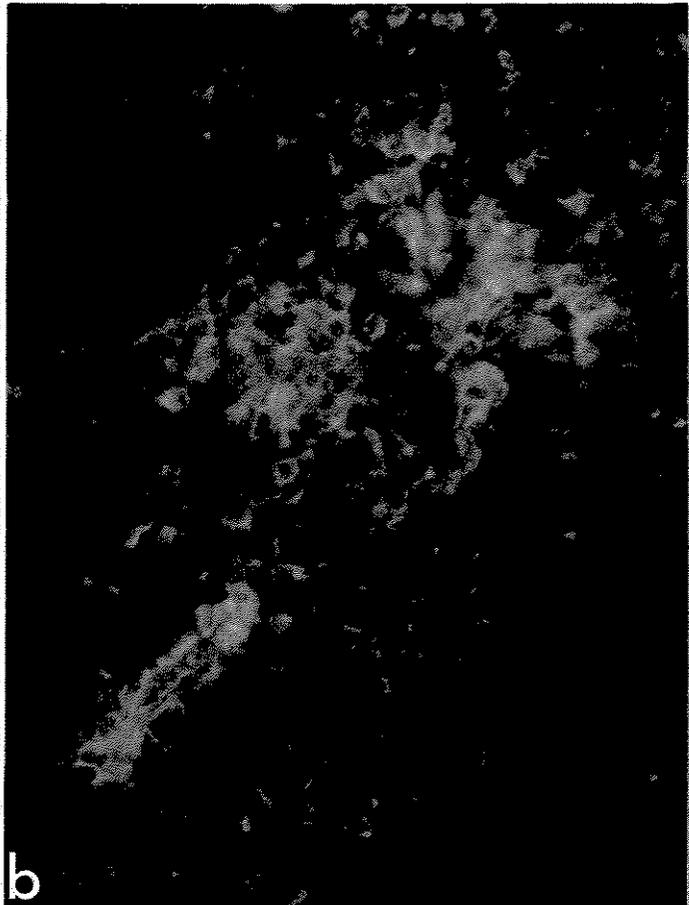
Prancha 3 - Fotomicrografias de cortes obtidos por congelamento nos quais foi realizada imunofluorescência para detecção de linfócitos T CD4+.

Figuras a e b - Intensa Marcação de linfócitos CD4 encontrada em infiltrados perivasculares de animais portadores da EAE sacrificados no 19ºdpi (400x).

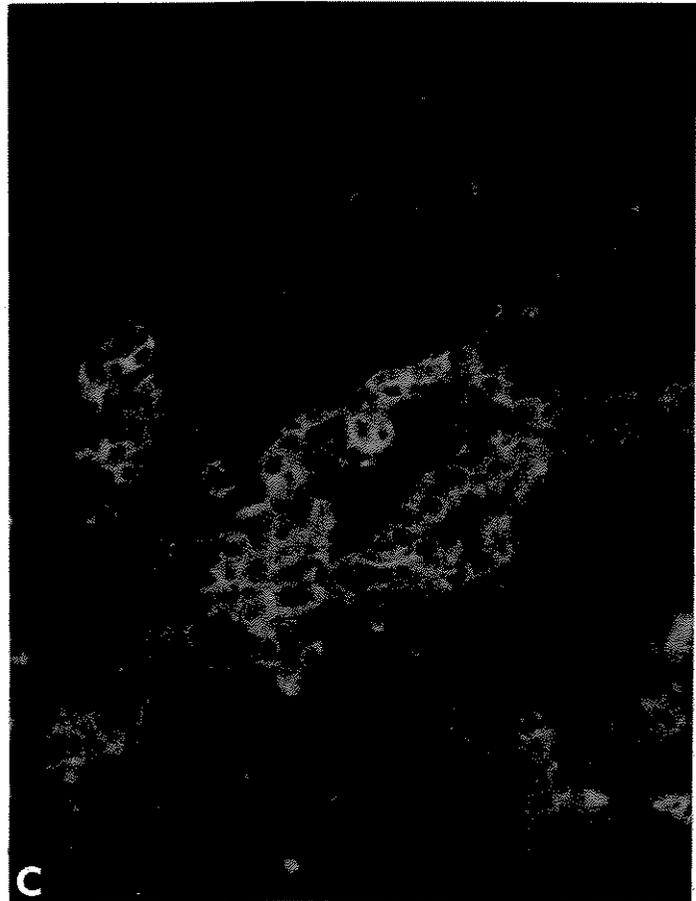
Figura c e d - Infiltrados perivasculares com a presença de várias células CD4+. Observar que a frequência destas células não parece diferir quando comparadas as figuras a e b, entretanto a intensidade da reação parece ser menor nestes cortes provenientes de animais tratados com gangliosídeos (400x).



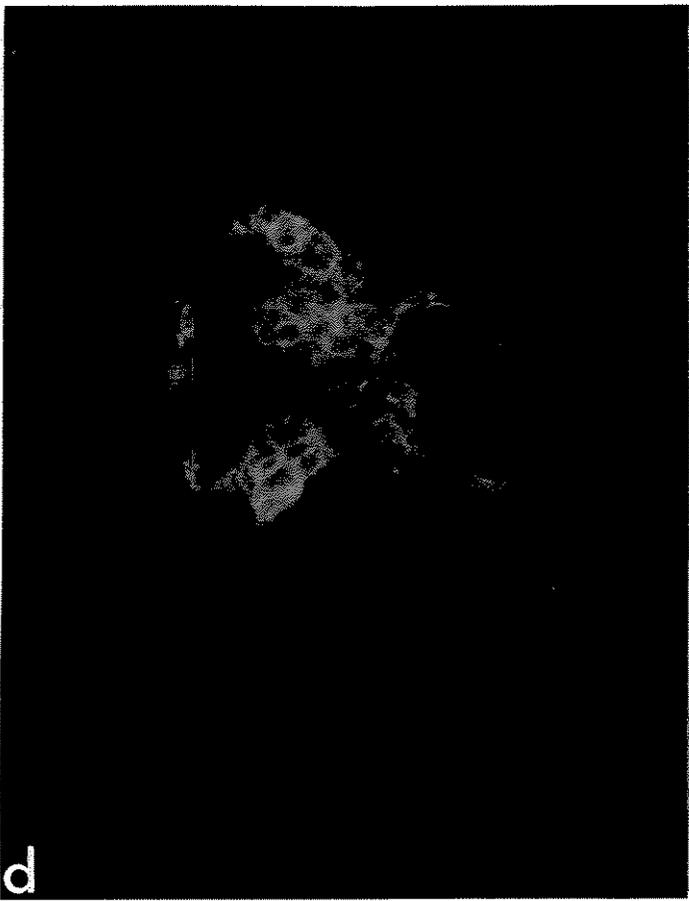
a



b



c



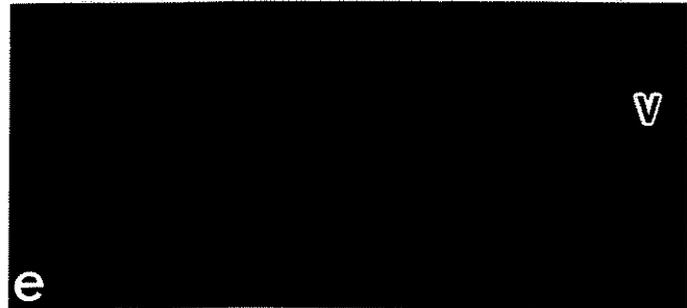
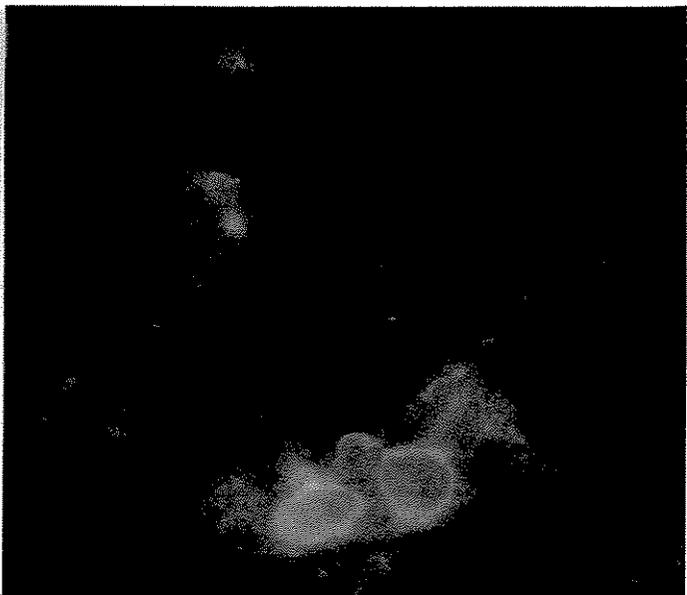
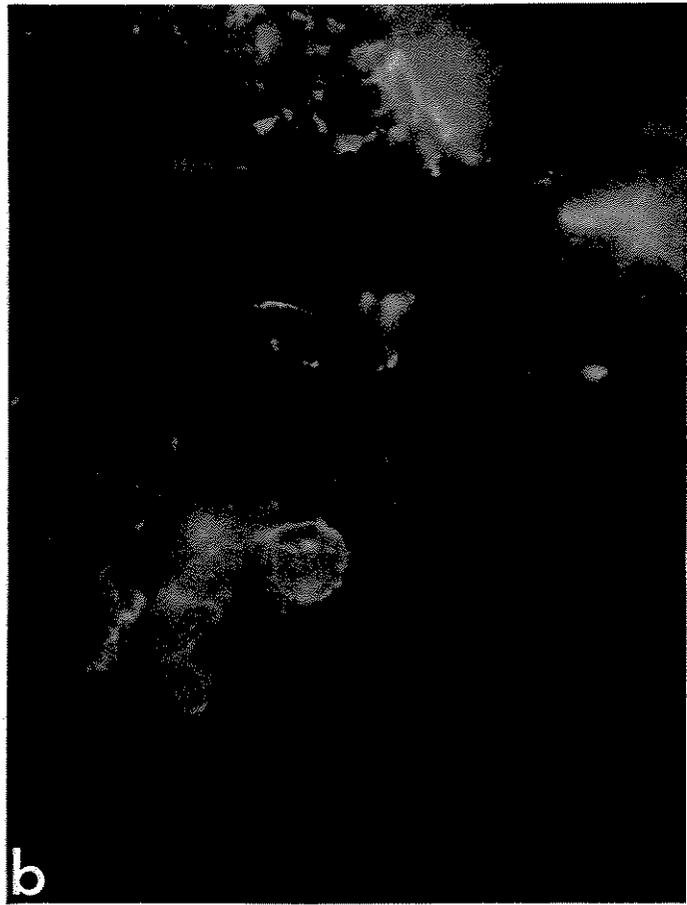
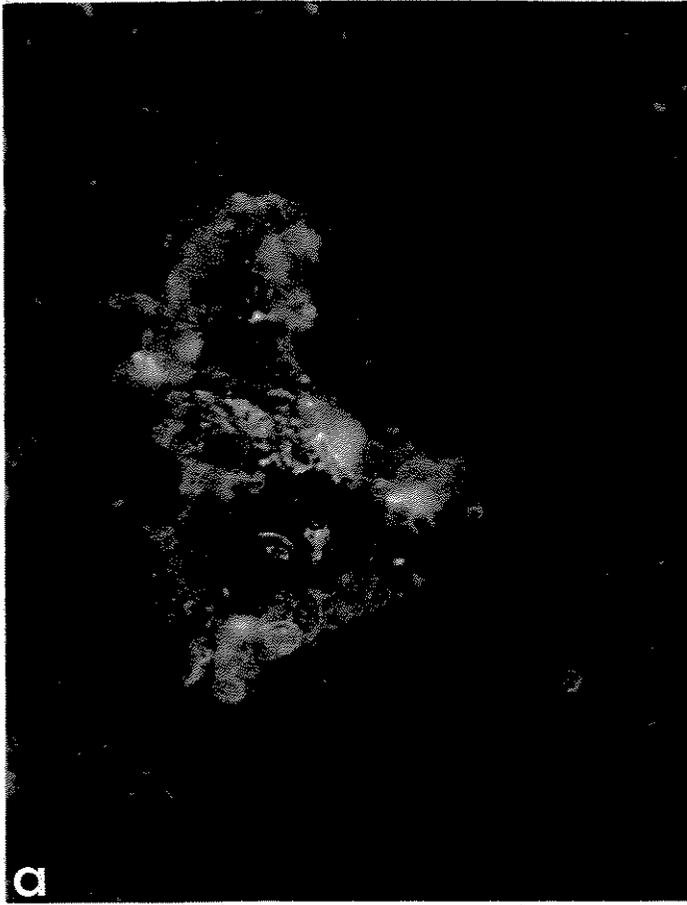
d

Prancha 4. Fotomicrografias de cortes obtidos por congelação nos quais foi realizada imunofluorescência para detecção de linfócitos T CD8+.

Figuras a e b - Em a, marcação de linfócitos CD8 encontrada em infiltrados perivasculares de animais portadores da EAE sacrificados no 19ºdpi. Observar marcação nítida limitada à membrana plasmática (400x). Em b, detalhe da figura a (1000x).

Figura c e d - Em c, marcação de linfócitos CD8 encontrada em infiltrados perivasculares de animais tratados com gangliosídeos com a presença de algumas células CD8+ (400x). Em d, detalhe da figura c (1000x).

Figura e - Controle negativo das reações mostradas nas pranchas 3 e 4 onde foi omitida a incubação com os anticorpos primários



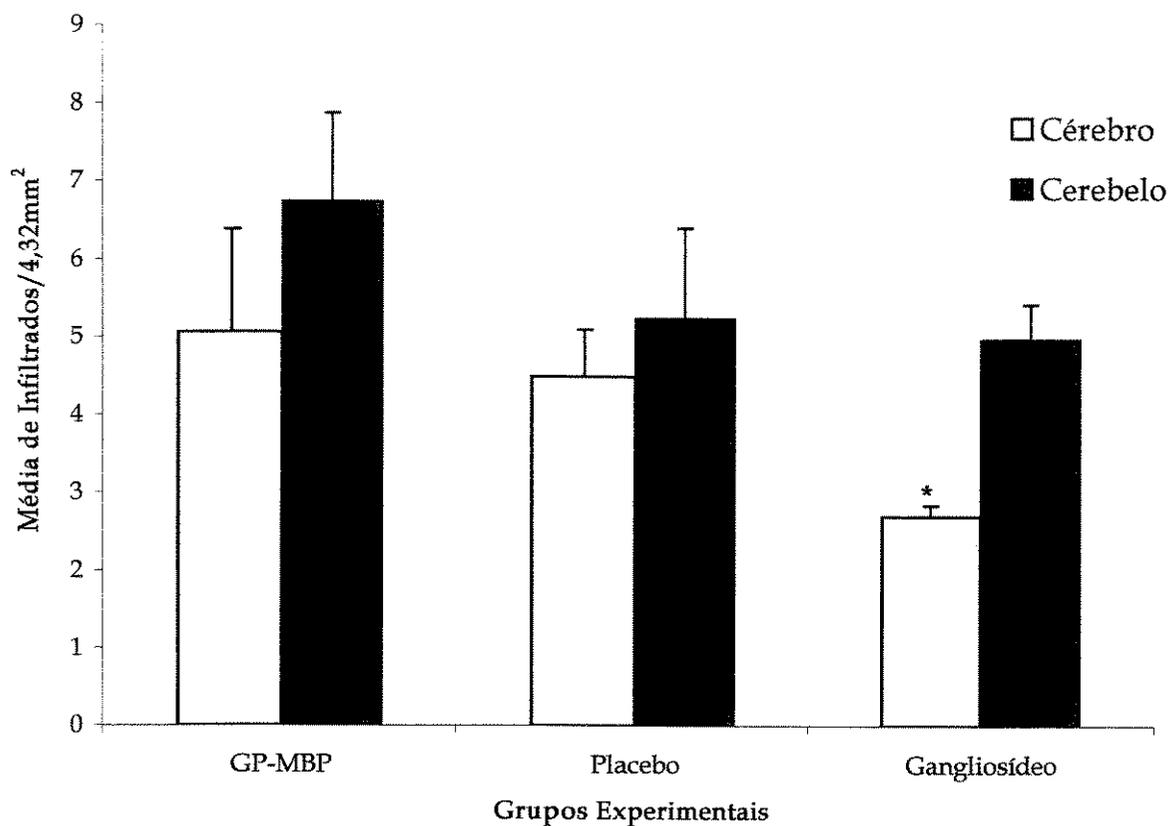


Figura 4. Média da contagem de infiltrados inflamatórios. Mesmo após o desaparecimento dos sinais clínicos a contagem dos infiltrados refletiu o escore clínico encontrado nos diferentes grupos. O número de infiltrados inflamatórios do cérebro presentes nos grupos 1A (GP-MBP) e 2A (placebo) não diferiram, entretanto, a contagem realizada nos animais do grupo 3A(gangliosídeos) foi significativamente menor ($p < 0.05$). O número de infiltrados inflamatórios encontrados no cerebelo não apresentou diferenças significativas entre os grupos experimentais.

4.3 Ensaio de Linfoproliferação

Os animais que compõem o Experimento B receberam inóculo com GP-MBP, CFA e *Mt*. No caso dos animais tratados com placebo ou gangliosídeos, estas substâncias foram administradas duas vezes ao dia do 7º ao 15ºdpi, dia em que foram sacrificados.

Para a realização do ensaio de linfoproliferação foram utilizados três protocolos: a) as células obtidas do baço foram mantidas durante o período de incubação com 500µg/ml da mistura de gangliosídeos diluída no meio de cultura; b) células estimuladas durante o período de incubação com 25µg/ml de GP-MBP; c) células sem estímulo, ou seja, mantidas apenas com o meio de cultura.

As culturas obtidas do grupo 1B (GP-MBP), apresentaram média de 730 cpm (+489) quando incubadas na presença de gangliosídeos; quando a cultura foi estimulada a resposta proliferativa foi de 12297 cpm (+3271), ao passo que a cultura sem estímulo apresentou média de 6607 cpm (+3667).

Estes dados demonstram uma acentuada redução na proliferação das células incubadas na presença de gangliosídeos, ao ser comparada com a resposta das culturas com ou sem estímulo ($p < 0.05$).

A resposta proliferativa das culturas de células originadas de animais do grupo 2B(animais tratados com placebo *in vivo*), quando incubadas com gangliosídeo (*in vitro*) a média foi de 778cpm (+392), na cultura estimulada foi em média de 5930cpm (+1818) e nas culturas sem estímulo foi de 2144 (+816). As células incubadas

com gangliosídeos apresentaram resposta proliferativa significativamente menor em comparação às demais ($p < 0.05$).

As culturas realizadas com células obtidas de animais do grupo 3B (animais tratados com gangliosídeos *in vivo*) não apresentaram comportamento diferente dos demais, com proliferação significativamente menor ($p < 0.05$) na cultura mantida com gangliosídeo (*in vitro*). Nestas, a média observada foi de 715 cpm (± 264), na cultura estimulada a média foi de 39920 cpm (± 1113), já na cultura sem estímulo a média foi de 1347 cpm (± 244).

Nos animais normais a média da leitura obtida para cultura realizada com gangliosídeo foi de 207 cpm (± 3), a cultura estimulada apresentou média de 2046 cpm (± 178) e na cultura realizada sem estímulo a média foi de 1659 cpm (± 1372).

A resposta proliferativa observada nas culturas de células de animais normais mostra que a cultura realizada na presença de gangliosídeos foi significativamente menor em relação à estimulada, embora não haja diferença estatisticamente importante quando comparada com a cultura sem estímulo.

A comparação dos vários grupos experimentais, demonstrou que não há diferença estatisticamente significante nas amostras incubadas com gangliosídeos. Nas culturas estimuladas e sem estímulo há uma diferença significativa entre o grupo 1B (GP-MBP) e os grupos 2B (placebo) e 3B (gangliosídeos) (figura 5).

Os animais que compõem Experimento A foram imunizados com GP-MBP, CFA e *Mt*. Nos grupos experimentais com tratamento, os animais receberam duas

injeções diárias de placebo ou gangliosídeo do 7º ao 15ºdpi e no 19º dpi foi realizado o sacrifício.

A resposta proliferativa da cultura de células dos animais do grupo 1A (GP-MBP) foi em média de 399 cpm (± 91), quando incubadas com gangliosídeos, 5253 cpm (± 2130) quando estimulada e 2418 cpm (± 991) na cultura sem estímulo.

A resposta proliferativa obtida da cultura de células dos animais do grupo 2A (placebo) incubada com gangliosídeos foi em média de 353 cpm (± 89), quando estimulada a média foi de 3378 cpm (± 1314) e na cultura sem estímulo a média foi de 1997 cpm (± 307).

A leitura das amostras dos animais do grupo 3A (gangliosídeos) incubadas na presença de gangliosídeos apresentaram média de 273 cpm (± 51), ao passo que nas amostra estimuladas a média foi de 3198cpm (± 1338) e 1313 cpm (± 367) nas amostras sem estímulo.

As culturas obtidas de animais normais apresentaram uma média de 263 cpm (± 44), nas culturas incubadas com gangliosídeos, 2026 cpm (± 893) quando estimuladas e 1115 cpm (± 581) nas amostras sem estímulo.

A comparação entre os grupos mostra que não há diferenças significativas, tanto nas culturas realizadas com estímulo de GP-MBP como nas culturas não estimuladas. Contudo, a resposta proliferativa das culturas incubadas com gangliosídeos foi significativamente menor (figura 6).

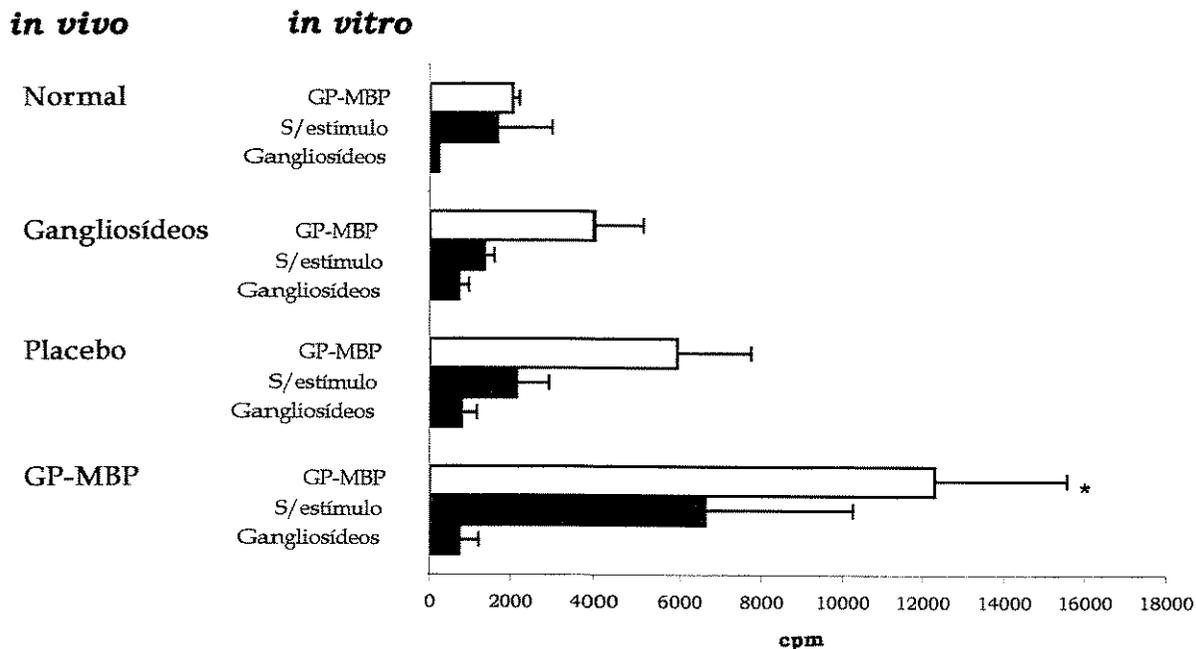


Figura 5. Ensaio de linfoproliferação dos animais sacrificados no 15º dpi. As culturas de células do baço foram realizadas com gangliosídeos, GP-MBP e sem estímulo. A incubação com gangliosídeo apresentou importante efeito inibitório sobre a resposta proliferativa. O grupo 1B (GP-MBP) demonstrou proliferação significativamente maior que os demais grupos, tanto nas culturas estimuladas com GP-MBP como naquelas sem estímulo ($p < 0.05$).

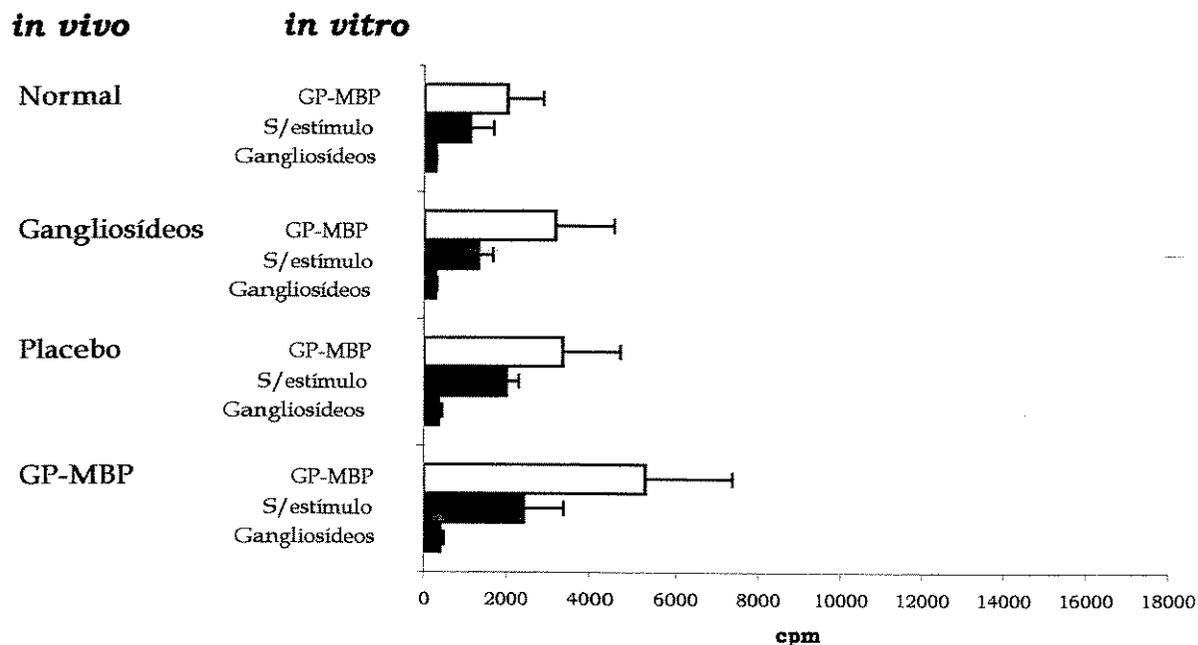


Figura 6. Ensaio de linfoproliferação dos animais sacrificados no 19º dpi. A resposta proliferativa obtida após a remissão dos sinais clínicos, demonstrou que não houve diferença significativa entre os diversos grupos experimentais. Observar a supressão exercida sobre a resposta proliferativa pela adição de gangliosídeos ao meio de cultura ($p < 0.05$).

4.4 Produção de TNF- α

A dosagem do TNF- α dos sobrenadantes de culturas de células obtidas dos animais do grupo 1B, apresentaram em média 101.4 ng/ml (\pm 13.2), quando a cultura celular foi estimulada pelo antígeno responsável pelo desencadeamento da doença (GP-MBP). O sobrenadante obtido a partir de cultura celular sem estímulo apresentou média de 64.5 ng/ml (\pm 17).

Os sobrenadantes obtidos a partir de cultura celular de animais do grupo 2A (placebo), apresentaram média de 70.47 ng/ml (\pm 13.2), quando estimulados com GP-MBP. A dosagem do TNF- α de sobrenadantes de culturas não estimuladas apresentou média de 91.24 ng/ml (\pm 8.4).

No grupo 3B (gangliosídeos), as leituras obtidas a partir de sobrenadantes de culturas estimuladas com GP-MBP apresentaram média de 6.04 ng/ml (\pm 3) e 16.8 ng/ml (\pm 15.7) nas culturas realizadas sem estímulo.

A dosagem realizada nos sobrenadantes de cultura de células provenientes de animais normais mostrou uma média de 0.26ng/ml (\pm 0.1) quando estimuladas com GP-MBP. A dosagem realizada em sobrenadante de cultura não estimulada apresentou média de 0.43 ng/ml (\pm 0.2).

Assim, a dosagem do TNF- α realizada em sobrenadante de cultura de células obtidas de animais sacrificados no 15ºdpi, correspondente ao auge dos sinais clínicos, mostrou que os grupos controle (GP-MBP e placebo) apresentaram níveis

muito elevados desta citocina, ao contrário dos animais tratados com gangliosídeos que apresentaram níveis significativamente mais baixos de TNF- α ($p < 0.05$) (figura 7).

Nos sobrenadantes de culturas obtidas de animais do grupo 1A (GP-MBP), sacrificados no 19º dpi, a leitura das amostras estimuladas com GP-MBP apresentaram média de 28.9 ng/ml (± 14.5), as amostras sem estímulo apresentaram média de 16.5 ng/ml (± 1).

As amostras obtidas dos animais do grupo 2A (Placebo), apresentaram média de 34.8ng/ml (± 11.5) ou quando estimuladas com GP-MBP. As amostras obtidas de culturas sem estímulo apresentaram média de 26.9 ng/ml (± 11.1).

Os sobrenadante de culturas de animais do grupo 3A (gangliosídeos) apresentaram média de 11.1ng/ml (± 4), quando estimuladas com GP-MBP. A leitura realizada nas amostras sem estímulo apresentaram média de 12.1ng/ml (± 2.2).

A dosagem realizada no animal normal mostrou média de 1.52 ng/ml (± 0.5) quando estimuladas com GP-MBP e média de 0.46 ng/ml (± 0.2) quando não estimuladas.

Estes dados demonstraram a presença do TNF- α em todas as amostras de sobrenadantes analisadas, tanto aquelas estimuladas com GP-MBP, como as não estimuladas.

Observou-se ainda que não há diferenças entre os grupos 1A e 2A (GP-MBP e placebo), sendo que este último apresentou níveis discretamente maiores desta citocina, embora esta diferença não tenha sido significativa. Por outro lado, as

amostras originadas de sobrenadantes de cultura células de animais do grupo 3A (gangliosídeos) apresentaram níveis significativamente menores de TNF- α (figura 8).

Para verificação das alterações do TNF- α durante a evolução da doença, foram comparadas as leituras realizadas no 15ºdpi, ou no auge dos sinais clínicos e no 19º dpi, quando os animais já se apresentavam recuperados (figuras 9a e 9b). Esta comparação realizada entre os grupos 1A e 1B demonstrou diminuição significativa ($p < 0.05$) nos níveis de TNF- α , tanto nas amostras obtidas de sobrenadantes de culturas estimuladas com GP-MBP como nas sem estímulo.

Nos grupos em que os animais foram tratados com placebo (2A e 2B), em amostras provenientes de sobrenadantes de culturas estimuladas com GP-MBP, houve uma pequena diminuição nos níveis de TNF- α , porém não significativa. Ao contrário, nas amostras obtidas de sobrenadantes de cultura não estimuladas, houve significativa diminuição nos níveis desta citocina ($p < 0.05$).

Comportamento diferente foi observado nos animais tratados com gangliosídeos (grupos 3A e 3B) onde, ao contrário dos demais grupos, houve ligeiro aumento nos níveis do TNF- α , tanto das amostras obtidas de culturas estimuladas com GP-MBP, como naquelas sem estímulo, embora esta alteração não tenha sido significativa.

Os animais normais apresentaram valores desprezíveis de TNF- α nos dois protocolos. Contudo, nas culturas de células realizadas com animais sacrificados no 19º dpi, foi observado aumento discreto de TNF- α , contudo sem significância.

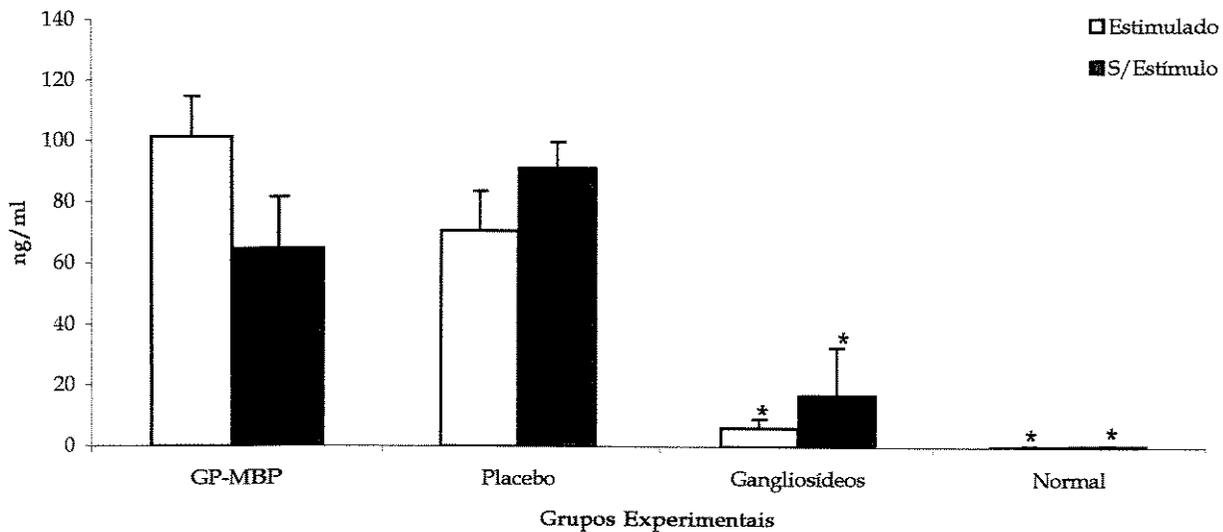


Figura 7. Dosagem de TNF- α em sobrenadante de cultura celular de animais sacrificados no 15^odpi. Este gráfico demonstra que a dosagem realizada no auge dos sinais clínicos em sobrenadantes de cultura celular dos grupos 1B (GP-MBP) e 2B (placebo) apresentou níveis de TNF- α significativamente maiores que nos sobrenadantes do grupo 3B (gangliosídeos) e animais normais, nas culturas realizadas com estímulo e sem estímulo ($p < 0.05$).

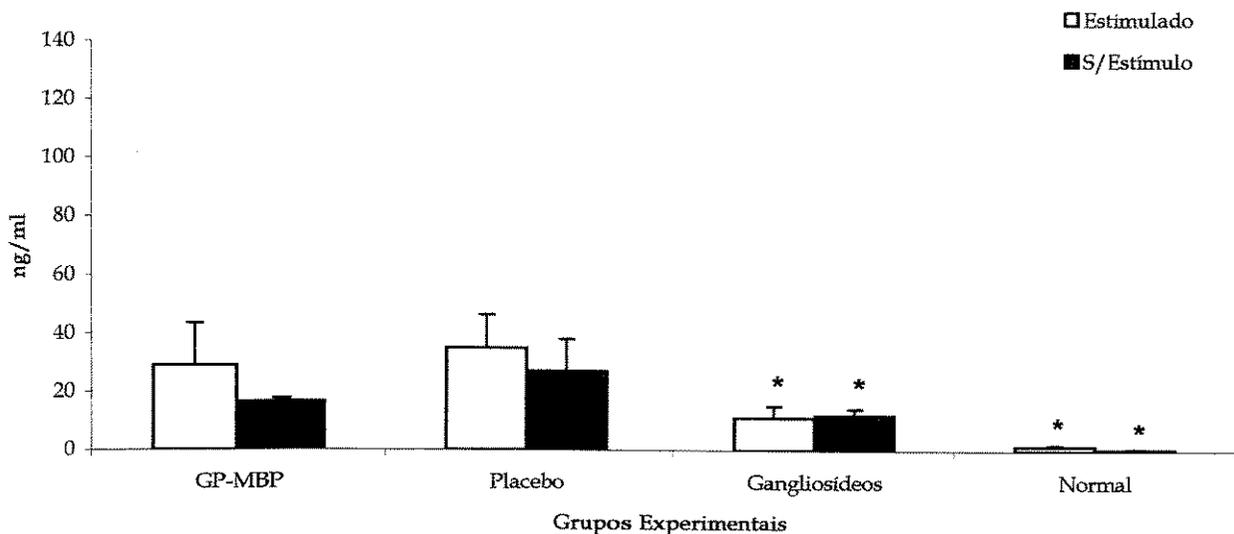
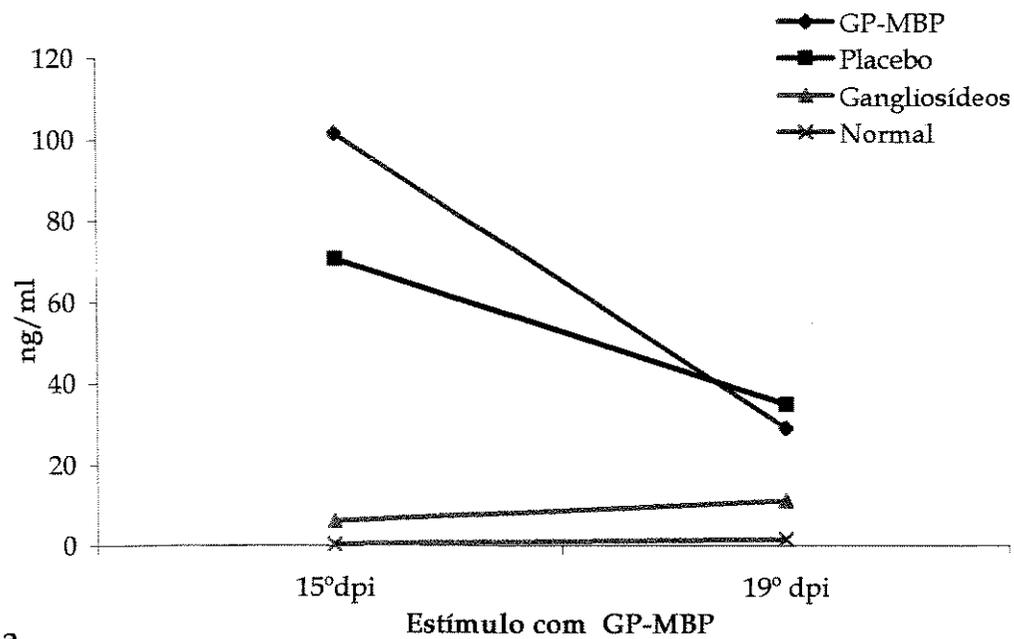
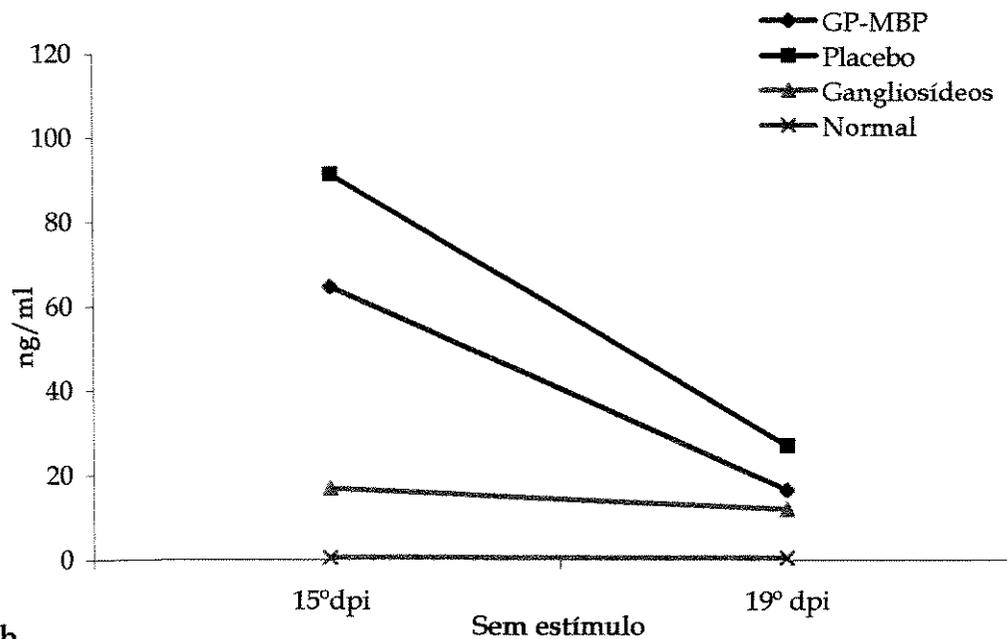


Figura 8. Dosagem de TNF- α em sobrenadante de cultura celular de animais sacrificados no 19^odpi. O gráfico demonstra que a dosagem realizada ao final dos sinais clínicos em sobrenadantes de cultura celular dos grupos 1B (GP-MBP) e 2B (placebo) manteve-se com níveis de TNF- α significativamente maiores que nos sobrenadantes do grupo 3B (gangliosídeos) e animais normais, nas culturas realizadas com estímulo e sem estímulo ($p < 0.05$).



a



b

Figura 9. Comparação dos níveis de TNF- α obtidos no 15ºdpi e 19ºdpi. Nas culturas estimuladas com GP-MBP e sem estímulo foi demonstrado uma grande diminuição dos níveis do TNF- α coincidente com o desaparecimento dos sinais clínicos. Observar que os animais tratados com gangliosídeo apresentaram um discreto aumento desta citocina no 19ºdpi, provavelmente em decorrência da suspensão do tratamento.

4.5 Produção de TGF- β

Os animais do grupo 1B que receberam inóculo de GP-MBP, CFA e *Mt*, e foram sacrificados no 15º dpi, apresentaram uma média de 0.011 ng/ml (± 0.003) tanto em sobrenadantes de culturas estimuladas com GP-MBP, como nos sobrenadantes de culturas sem estímulo.

Os animais do grupo 2B receberam o inóculo com GP-MBP, CFA e *Mt*, e tratamento com duas injeções diárias de placebo e foram sacrificados no 15º dpi. Os sobrenadantes de culturas provenientes destes animais quando estimuladas com GP-MBP apresentaram uma média de 0.024 ng/ml (± 0.019) e os sobrenadantes de culturas não estimuladas apresentaram uma média de 0.009 ng/ml (± 0.003).

Os animais do grupo 3B receberam inóculo com GP-MBP, CFA e *Mt*, e foram tratados com duas injeções diárias da mistura de gangliosídeos a partir do 7º dpi até a data do sacrifício no 15º dpi. Os sobrenadantes de cultura celular obtido destes animais apresentaram níveis mais elevado de TGF- β , embora não significativo. A média encontrada em sobrenadantes de culturas estimuladas com GP-MBP foi de 0.271 ng/ml (± 0.15) e a média dos sobrenadantes de culturas não estimuladas foi de 0.2ng/ml (± 0.132).

Os animais normais apresentaram os índices mais elevados desta citocina. Nos animais sacrificados no 15º dpi, o sobrenadante de culturas realizadas na presença de GP-MBP apresentou média de 1.043 ng/ml (± 0.147) e nas amostras obtidas de

sobrenadante de cultura não estimulada uma média de 0.937 ng/ml (± 0.071), valores estes significativamente mais elevados que os demais grupos ($P < 0.05$).

Em todos os grupos experimentais foram observadas diferenças entre as leituras obtidas do sobrenadante de cultura celular, contudo desprovidas de significância (figura 11).

O sobrenadante de culturas do grupo 1A (GP-MBP), sacrificados no 19º dpi apresentaram média de 6.83 ng/ml (± 1.5) quando estimulado com GP-MBP, e 7.4 ng/ml (± 1.5) nas culturas não estimuladas.

A dosagem realizada nos animais foi grupo 2A (placebo) do sobrenadante de culturas estimuladas com GP-MBP foi de 6.85ng/ml (± 1.7). Nos sobrenadante de culturas não estimuladas a média foi de 7.35 ng/ml (± 1.7).

A quantidade obtida a partir do sobrenadante de culturas de animais do grupo 3A (gangliosídeo) quando estimuladas com GP-MBP foi de 7.06ng/ml (± 1.2), em sobrenadante de culturas sem estímulo esta foi de 7.6ng/ml (± 1.4).

A realização das dosagens feitas de sobrenadante de cultura dos animais normais estimulados com GP-MBP, apresentaram média de 0.79 ng/ml (± 0.04) e 0.94 ng/ml (± 0.07) quando não estimulado.

A análise dos valores acima indicam que entre os grupos experimentais não houve diferença significativa na presença de TGF- β , embora os animais tratados com gangliosídeos tenham demonstrando níveis ligeiramente mais elevados desta citocina (Figura 12).

A comparação das dosagens realizadas no 15^o e 19^odpi, demonstrou significativo aumento na presença do TGF- β no 19^o dpi, data em que os animais já estavam recuperados, quer nas culturas estimuladas ou não. Ao contrário, as dosagens realizadas nos animais normais não apontaram para diferenças significativas, mantendo-se sempre em valores relativamente próximos (figuras 13a e 13b).

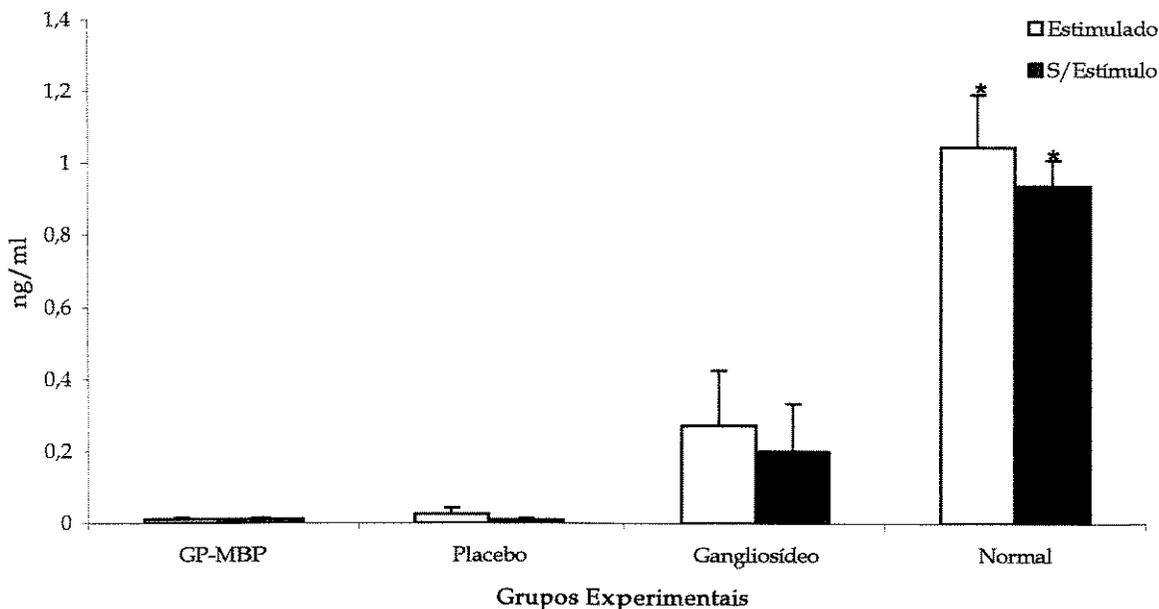


Figura 10. Dosagem de TGF- β em sobrenadante de cultura celular de animais sacrificados no 15ºdpi. Quantias mínimas de TGF- β foram encontradas nos sobrenadantes dos grupos experimentais no momento em que os animais apresentavam os sinais clínicos mais graves, embora não tenha havido diferenças significativas entre os grupos experimentais ($p < 0.05$).

Dosagem TGF- β Grupo P1 - Sacrifício no 19º dpi

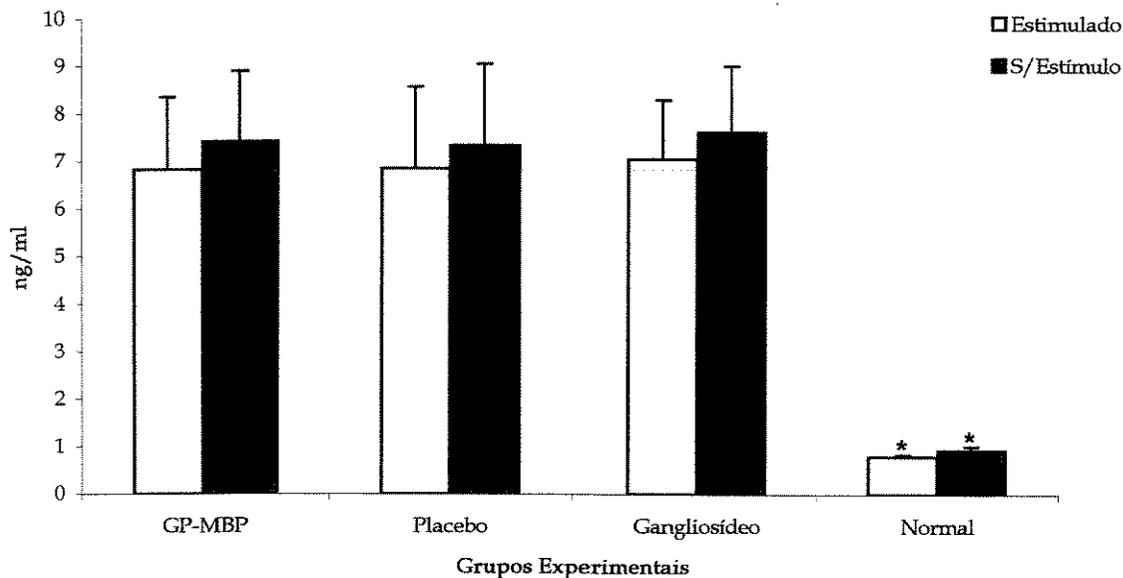
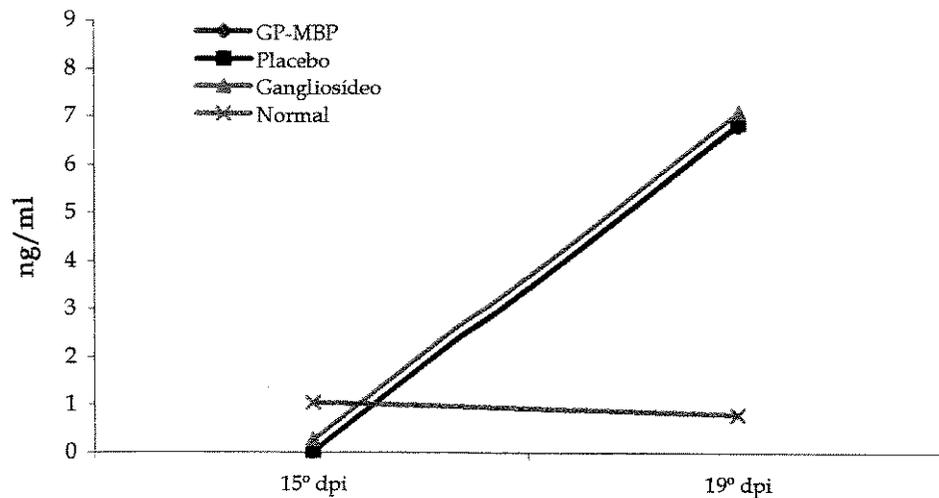
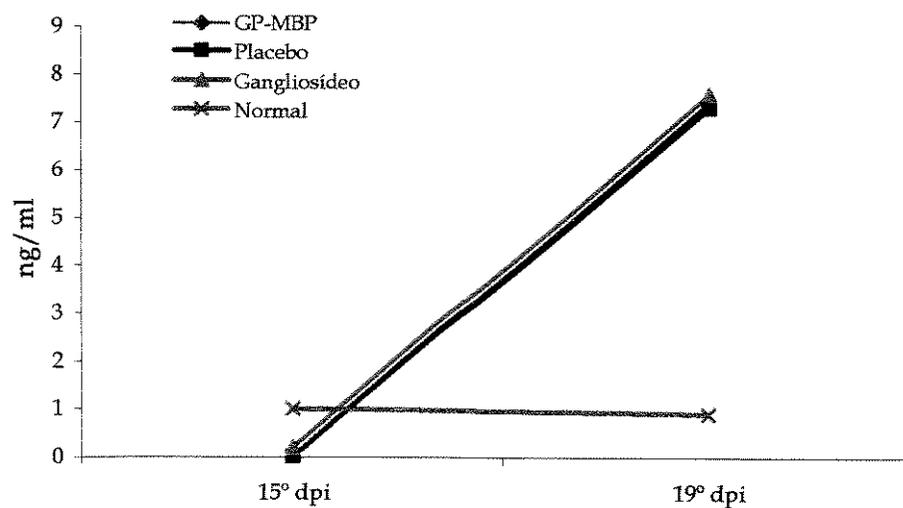


Figura 11. Dosagem de TGF- β em sobrenadante de cultura celular de animais sacrificados no 19ºdpi. As leituras realizadas nestes grupos mostra que não houve diferenças significativas entre os vários grupos experimentais, porém, observou-se que os animais tratados com gangliosídeos apresentaram níveis ligeiramente maiores desta citocina ($p < 0.05$).



a

Estimulado com GP-MBP



b

Sem estímulo

Figura 12. Comparação dos níveis de TGF- β obtidos no 15°dpi e 19°dpi. Observar o significativo aumento desta citocina na recuperação dos animais. Os animais tratados com gangliosídeos nos dois momentos em que foram realizadas as dosagens apresentam níveis maiores desta citocina. Embora os animais normais sacrificados no 19°dpi tenham apresentado quantias menores, esta diferença não foi significativa.

Neste trabalho foi demonstrado que o tratamento diário com gangliosídeos durante a fase efetora da doença foi capaz de abrandar ou mesmo evitar os sinais clínicos da EAE. Os animais tratados apresentaram menor incapacidade neurológica, observou-se que em alguns animais não houve a manifestação clínica da doença durante o período de tratamento. Observações corroboradas pelas análises imunistoquímicas, morfométricas e pela produção do TNF- α

Segundo protocolo adotado, os animais receberam 100 mg/kg da mistura de gangliosídeos durante a fase efetora da EAE, ou seja do 7^o ao 15^odpi. O escore clínico observado nesses animais foi significativamente menor, quando comparado aos animais não tratados, demonstrando a eficácia da dose de gangliosídeos administrada.

A interrupção do tratamento fez com que estes sinais se tornassem mais graves, embora tais animais jamais tenham apresentado a doença na sua forma plena ou tenham vindo a óbito, como observado nos demais grupos. Esta constatação leva a crer que a ação dos gangliosídeos é dependente não só da dose administrada, mas também do período durante o qual o tratamento é mantido.

Há estudos demonstrando que a administração dos gangliosídeos na fase de sensibilização da EAE, ou mesmo sua aplicação junto com o inóculo, não provoca alterações no curso da doença. O resultado efetivo da ação dos gangliosídeos é observado na fase efetora, havendo correlação direta entre os benefícios observados

pela sua administração e a gravidade dos sinais clínicos (SHIMADA *et al.*, 1993; SAEZ-TORES *et al.*, 1998).

Nossas observações estão de acordo com os resultados encontrados por SHIMADA e colaboradores (1994). Neste estudo foi testada a administração de diferentes doses de gangliosídeos e sua resposta sobre a indução da EAE. Os autores verificaram que a administração diária de 100mg/Kg de gangliosídeos em ratos Lewis, suprime significativamente as manifestações neurológicas e lesões histológicas.

A inibição da resposta imune induzida por gangliosídeos, tem efeito máximo quando sua ação é exercida durante a fase inicial da ativação. Desta forma, linfócitos devem manter contato com estas substâncias durante um período mínimo, até que o efeito inibitório seja estabelecido (DYATLOVITSKAYA & BERGELSON, 1987).

O estudo histológico demonstrou que a morfologia da lesão em todos os grupos experimentais apresentaram características comuns. A análise destas lesões, realizada em cortes corados com HE, evidenciou que os infiltrados inflamatórios apresentavam a mesma população celular, tanto nos animais dos grupos controle (GP-MBP e placebo) como nos animais tratados com gangliosídeos

A quantificação destes infiltrados comprovou a proteção observada nos sinais clínicos, uma vez que os animais tratados apresentaram número significativamente menor no cérebro. Correlacionando os sinais clínicos da EAE com os achados histológicos, INOUE e colaboradores(1996), demonstraram na medula espinhal de camundongos a ausência de infiltrados inflamatórios nas meninges e no parênquima

de animais com EAE, tratados durante a fase efetora da doença com gangliosídeos (INOUE, *et al.*, 1996).

Além disso, o estudo da cinética da lesão provocada pela EAE, mostra que, inicialmente, a inflamação é detectada na porção torácica e lombar da medula espinhal, aproximadamente 24 horas após, a resposta inflamatória se propaga, envolvendo toda medula espinhal e cerebelo, mesencéfalo e algumas áreas do prosencéfalo. Dois a três dias após o início da EAE, a inflamação diminui em aproximadamente 50%, coincidindo com a recuperação clínica. Contudo, a resposta inflamatória no mesencéfalo e diencéfalo continuam a aumentar durante este período (BERGER *et al.*, 1997).

A detecção do filamento intermediário GFAP é um importante indicativo da ocorrência da gliose reativa nas lesões provocadas pela EAE, por essa razão, a demonstração de sua presença poderia fornecer subsídios comparativos sobre o comprometimento do tecido nervoso nos diferentes grupos experimentais.

A análise imunoistoquímica realizada para detecção do GFAP, sugeriu a ocorrência de uma pequena reação astrocitária frente à lesão provocada pela indução da doença.

Sabe-se que durante a EAE os astrócitos expressam altos níveis de MHC II em resposta ao IFN- γ , desta forma passam a se comportar como células imunocompetentes, efetuando a apresentação de antígenos para linfócitos T (CHUNG *et al.*, 1991).

Segundo MASSA (1993), gangliosídeos suprimem especificamente a expressão do MHC classe I e II e da ICAM-1 induzida por IFN- γ . Entretanto, não foi possível estabelecer, diferenças qualitativas entre os grupos controle (GP-MBP e placebo) e o grupo tratado com gangliosídeo.

Dando continuidade à caracterização das células presentes nas lesões provocadas pela EAE, efetuou-se a imunistoquímica para detecção de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, dada a importância destas na gênese e recuperação da doença.

Em cortes obtidos de animais tratados com gangliosídeos, verificou-se que a imunorreatividade à marcação com W3/25, anticorpo que detecta a presença de linfócitos T CD4⁺ é menor, quando comparada aos cortes obtidos de animais sem tratamento (GP-MBP e placebo).

O tratamento com gangliosídeos pode inibir a expressão da molécula de superfície celular, presente nos linfócitos T CD4 e reconhecida pelo anticorpo monoclonal W3/25, (OFFNER *et al.*, 1987). Sugerindo que os gangliosídeos podem se inserir na membrana e se ligar às moléculas associadas ao CD4, reduzindo sua expressão (GAROFALO *et al.*, 1998).

Entretanto, a imunorreatividade observada na identificação do linfócitos CD8 não pôde ser diferenciada qualitativamente nos grupos experimentais. Embora sua presença seja detectada nos infiltrados inflamatórios, verifica-se que a marcação é menos frequente. IKEDA e colaboradores (1992) demonstraram que a atuação de

gangliosídeos sobre a molécula de CD8 é quase inexistente, confirmando as observações feitas neste trabalho.

Nos experimentos *in vitro* pôde ser verificado que os gangliosídeos exercem poder inibitório sobre a linfoproliferação quando adicionados ao meio de cultura juntamente com os linfócitos, independente do grupo experimental, inclusive nas culturas obtidas de animais normais.

As culturas estimuladas com GP-MBP apresentaram resposta proliferativa menor nos animais tratados com gangliosídeos. Esta resposta ao que parece, deriva da presença de gangliosídeos no organismo dos animais tratados com gangliosídeos, de forma que sua ação ainda se reflete na resposta proliferativa obtida nas culturas, mesmo após o período de incubação.

Por outro lado, os animais tratados com placebo apresentaram um valor intermediário da resposta proliferativa entre o grupo 1B(GP-MBP) e 3B (gangliosídeos).

Como esses animais foram expostos a aplicações de duas injeções diárias de placebo, é possível que o estresse provocado por esta manipulação possa ter alterado a resposta proliferativa. Sabe-se que o estresse está associado com as alterações nos mecanismos celulares e humorais em animais de laboratório e em humanos. A diminuição da resposta proliferativa à mitógenos e antígenos, assim como a citotoxicidade mediada por linfócitos tem sido observados após a exposição à agentes estressantes (FREIER, 1990).

Reforçando esta hipótese, pôde-se verificar que as culturas celulares obtidas de animais dos diferentes grupos sacrificados no 19º dpi não apresentam diferenças estatisticamente significantes.

In vitro, estes glicoesfingolípides são capazes de inibir muitos passos da resposta imune celular, como o processamento de antígenos, sua apresentação, proliferação e função citotóxica. A ação inibitória dos gangliosídeos há muito é conhecida, sendo que as pesquisas estão voltadas para identificação dos possíveis mecanismos envolvidos (LADISCH *et al.*, 1994).

Os gangliosídeos podem ligar-se às células por interação de sua cadeia glicídica com proteínas de membrana, ou através da incorporação de sua porção hidrofóbica à bicamada lipídica da membrana plasmática. Podendo bloquear sítios de ligação específicos, fornecendo posteriormente sítios de ligação adicionais, atuando desta forma como receptores, ou co-receptores (BERGELSON, 1995).

A ação dos gangliosídeos parece estar direcionada sobre os linfócitos Th1, nos quais a produção de citocinas fica impedida, assim como sua proliferação, pelo bloqueio da fosforilação da Rb, proteína que uma vez fosforilada libera outras proteínas regulatórias permitindo a transição da fase G-1 para fase S em linfócitos. O bloqueio da fosforilação da proteína Rb, faz com que as proteínas regulatórias permaneçam sequestradas, atrasando desta forma o ciclo celular (IRANI *et al.*, 1996).

Outro fator que contribui para inibição é a interferência do gangliosídeo no sistema da IL-2 e seu receptor o IL-2r, envolvendo a competição deste último pela

ligação com a citocina disponível, fundamental para resposta proliferativa (LU & SHAROM, 1995).

Uma vez incorporados à membrana celular dos linfócitos, os gangliosídeos podem diminuir ou eliminar a expressão da molécula de CD4, pela interação com moléculas adjacentes que resulta no mascaramento ou endocitose do mesmo, em virtude da dissociação da proteinaquinase p56^{lck} da cauda citoplasmática do CD4 (BERGELSON, 1995).

Os gangliosídeos exógenos também são capazes de induzir a elevação da concentração de Ca²⁺ intracelular livre, de forma provavelmente dependente da p56^{lck}. A diversidade estrutural da porção glicídica dos gangliosídeos pode afetar as interações físicas entre estes e proteínas, o que pode ser importante para os efeitos observados (NOHARA *et al.*, 1997).

A desorganização do CD4 na membrana plasmática é um evento molecular que ocorre pela ativação da proteinaquinase C, que induz a fosforilação dos resíduos de serina na porção citoplasmática desta molécula, conseqüentemente levando a dissociação do complexo CD4-p56^{lck}. O tratamento dos linfócitos com gangliosídeos leva à redistribuição, agrupamento e internalização por vesículas endocíticas e posterior degradação intracelular da molécula de CD4 (GAROFALO *et al.*, 1998).

É interessante observar que gatos apresentando os sinais clínicos da GM1 gangliosidose felina (modelo da GM1 gangliosidose juvenil) apresentam involução tímica prematura caracterizada pela diminuição das populações de linfócitos T,

especialmente da sub-população de CD4+/CD8+ imaturos. O aumento de gangliosídeos na superfície resulta na apoptose de linfócitos T imaturos (ZHOU *et al.*, 1998).

Outro mecanismo provável de imunomodulação é a possível indução de apoptose das células imunocompetentes, e a modulação das moléculas de superfície por gangliosídeos incorporados na membrana celular que bloqueiam a ativação destas células, paralisando a resposta imune. É possível ainda que gangliosídeos possam interagir com um alvo intracelular, tais como a calmodulina, modulando provavelmente a atividade deste intermediário chave na tradução do sinal do Ca²⁺ (DUMONTET, *et al.*, 1994).

Foi demonstrado que o GD3 pode mediar sinais apoptóticos após acúmulo de ceramida intracelular através do recrutamento da mitocôndria para o programa de morte celular. Este recrutamento se dá através do desvio de gangliosídeos do aparelho de Golgi para a mitocôndria, afetando desta forma, a permeabilidade de membrana desta organela (DE MARIA *et al.*, 1997).

Por outro lado, observou-se que o tratamento com gangliosídeos pode afetar a produção de citocinas, principalmente aquelas liberadas por linfócitos Th1.

O TNF- α é uma das principais citocinas envolvidas na gênese da EAE, sendo também responsável pela maioria das lesões ocorridas nesta doença. Há vários trabalhos demonstrando que em pacientes com EM seus níveis estão intimamente relacionados com o estágio da doença, pacientes em períodos de exacerbação

apresentam maior concentração de RNAm desta citocina, que aqueles em remissão (BEGOLKA & MILLER, 1998).

Os resultados obtidos à partir dos sobrenadantes de cultura celular provenientes de animais tratados e não tratados com gangliosídeos reforçam esta observação. As dosagens de TNF- α feitas nos grupos GP-MBP e placebo no 15º dpi mostram altos níveis desta citocina, estes animais apresentaram sinais clínicos graves, chegando em alguns à tetraplegia e morte. Por outro lado, no 19ºdpi quando os sinais clínicos já desapareceram, estes níveis diminuem significativamente.

As dosagens obtidas dos animais tratados com gangliosídeos demonstrou níveis baixos de TNF- α nos dois períodos analisados, porém o grupo sacrificado no 19ºdpi (grupo 3A) apresentou ligeira elevação, embora os animais estivessem recuperados. Ao que parece o metabolismo do gangliosídeo ocorre de forma rápida, de maneira que a sua suspensão no 15ºdpi leva à conseqüente piora dos sinais clínicos e aumento da produção do TNF- α , que pôde ser detectada mesmo após o desaparecimento sinais.

Gangliosídeos são capazes de bloquear a produção do TNF- α atuando diretamente na produção de citocinas pelos linfócitos Th1. A inibição ocorre na transcrição, uma vez que a biogênese do RNAm destas proteínas é evitado. Este efeito pode ser explicado pelo fato dos gangliosídeos serem capazes de bloquear a localização nuclear da NF- κ B em linfócitos T. A NF- κ B constitui-se numa proteína que, uma vez liberada, migra para o núcleo ativando a transcrição dos genes das citocinas (IRANI *et al.*,

1996).

Gangliosídeos são capazes de se ligar ao TNF- α suprimindo sua ação. Esta ligação depende em grande parte da estrutura oligossacarídica do glicoesfincolípide, enquanto que a supressão da expressão depende da estrutura íntegra do mesmo (BERGELSON, 1995). Portanto, o efeito exercido sobre a proteína NF-kB já é o suficiente para explicar a ação dos gangliosídeos na expressão dos genes do TNF- α , que aparentemente são regulados por este fator nuclear (ZIEGLER-HEITBROCK *et al.*, 1992).

A adição de gangliosídeos *in vitro* é capaz de evitar a lise mediada pelo TNF- α sobre fibroblastos da linhagem L929 de forma dose-dependente, além disso, medeiam a proteção contra lesões induzidas por esta citocina através da proteção do DNA da célula-alvo (KOIKE *et al.*, 1993).

A expressão do TNF- α pode ser bloqueada por citocinas anti-inflamatórias como o TGF- β , que atua na transcrição e tradução do DNA (BENVENISTE, 1997). O aumento da atividade do TGF- β foi demonstrado em sobrenadantes de cultura de sangue de pacientes com EM, testados durante o período de remissão dos sintomas (NAVIKAS & LINK, 1996).

No presente trabalho foi realizada a dosagem do TGF- β no intuito de verificar a possível ação dos gangliosídeos sobre a produção desta citocina. A cultura realizada em animais sacrificados no 15ºdpi demonstrou que no auge da doença esta citocina encontra-se presente em pequenas quantidades em todos os grupos experimentais,

sem que haja diferença significativa entre eles. Estes dados são consistentes com estudos realizados com hibridização *in situ*, onde verificou-se o aparecimento do RNAm após a detecção do IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-4, ou seja, citocinas envolvidas na gênese da doença (OLSSON, 1995).

A quantificação das células CCL64 por incorporação da ^3H -Timidina não demonstrou diferenças entre os grupos, observa-se na quantificação que os grupos GP-MBP e placebo apresentam quantidades menores desta citocina, enquanto o grupo tratado apresenta dez vezes mais TGF- β que os demais grupos.

Após a recuperação dos sinais clínicos, a dosagem realizada nos animais sacrificados no 19ºdpi, indica situação diferente. Neste período os valores obtidos aumentaram significativamente em todos os grupos. Entretanto, os animais tratados com gangliosídeos apresentaram presença maior de TGF- β no sobrenadante das culturas, embora a incorporação de ^3H -Timidina não tenha sido significativamente diferente.

Linfócitos T do baço que secretam TGF- β atuam como supressores na EAE. O aumento desta citocina durante a recuperação dos sinais clínicos tem sido observado também na neurite alérgica experimental e na artrite induzida por colágeno (KIEFER *et al.*, 1998; LETTERIO & ROBERTS, 1998).

Os linfócitos T supressores que aparecem quando o rato se recupera da EAE, inibem a secreção de IFN- γ , IL-1, IL-6 e TNF- α , pelas células encefalitogênicas, demonstrando que esta citocina pode atuar diretamente sobre as células Th1. Além de

reduzir a ligação de linfócitos ativados ao endotélio cerebral, tal efeito evita a migração destas células para o sítio da lesão (IWAHASHI *et al.*, 1997; SMELTZ & SWANBORG, 1998).

As quantidades de TGF- β detectadas entre os animais normais apresentaram valores próximos a 1ng/ml, independente da data de sacrifício. Entretanto o fato destes animais não terem recebido qualquer estímulo para o desenvolvimento da doença, indicam provavelmente, os níveis basais desta citocina, de forma inativa que não se liga ao seu receptor (IWAHASHI *et al.*, 1997). Esta citocina atua no desenvolvimento, na diferenciação e crescimento das células epiteliais. Dos peptídeos conhecidos, o TGF- β talvez seja o mais pleiotrópico e multifuncional isto é, além de ser produzido por quase todos os tipos celulares, também têm atuação ampla no organismo, do controle da diferenciação e crescimento celular à regulação funcional e de atividade do gene-alvo (LETTERIO & ROBERTS, 1998).

Como já observado, os gangliosídeos interferem com a resposta imune celular através de vários mecanismos como a inibição reversível do processamento/apresentação do leucócito, ligação direta a citocinas, diminuição da expressão do CD4 e apoptose, além de proteger da ocorrência da apoptose induzida pelo TNF- α (LADISCH *et al.*, 1994).

Este é um ponto importante para estudos posteriores relacionados à EAE, em modelos crônicos da doença onde ocorra a desmielinização, uma vez que estes compostos podem atuar em duas frentes, no sistema imune inibindo sua ação; e no

SNC, evitando não só o aumento da lesão, como também auxiliando na regeneração do mesmo. No SNC, os gangliosídeos podem atuar de forma inibitória ou estimulatória sobre a fosforilação das proteínas neurais incluindo a MBP e MAG, o que pode modular sua interação com elementos do citoesqueleto. Esta fosforilação é catalisada em parte por proteinaquinases C e possivelmente outras quinases ativadas pelo Ca^{2+} , a qual tem importante papel na diferenciação dos oligodendrócitos (YIM *et al.*, 1994).

6. Conclusões

Considerando os dados experimentais obtidos no modelo experimental utilizado no presente trabalho, podemos concluir:

- ◆ A administração de gangliosídeos na dose de 100mg/Kg durante a fase efetora da EAE, protege o animal da ocorrência da doença em sua forma mais grave.
- O agravamento dos sinais clínicos com a interrupção do tratamento, evidencia o papel imunossupressor dos gangliosídeos sobre os fatores que levam à EAE.
- ◆ Os dados obtidos das análises imunoistoquímica e morfométrica reforçam a idéia da ação imunomoduladora dos gangliosídeos sobre os elementos celulares do sistema imune envolvidos na EAE.
- ◆ Nossos resultados permitem inferir que um dos mecanismos de ação dos gangliosídeos pode estar relacionado com a inibição da produção do TNF- α

7. Referências Bibliográficas

- ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H. and POBER, J.S. 1994. Cytokines. In: ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H. and POBER, J.S. (Ed.), Cellular and Molecular Immunology. W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 239-260.
- ABBAS, A.K., MURPHY, K.M. and SHER, A. 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383, 787-793.
- AMOR, S., BAKER, D., LAYWARD, L., McCORMACK, K. and van NOORT, J.M. 1997. Multiple sclerosis: variations on a theme. *Immunol. Today* 18, 368-371.
- ANDERSON, P.B. and GOODKIN, D.E. 1998. Glucocorticosteroid therapy for multiple sclerosis: a critical review. *J. Neurol. Sci.* 160, 16-25.
- ASBURY, A.K. 1994. Gangliosides and peripheral neuropathies: an overview. *Prog. Brain Res.* 101, 279-287.
- BALABANOV, R. and DORE-DUFFY, P. 1998. Role of the CNS microvascular pericyte in the blood-brain barrier. *J. Neurosci. Res.* 53, 637-644.
- BEGOLKA, W.S. and MILLER S.D. 1998. Cytokines as intrinsic and exogenous regulators of pathogenesis in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Res. Immunol.* 149, 771-781.
- BERGELSON, L.D. 1995. Serum gangliosides as endogenous immunomodulators. *Immunol. Today* 16, 483-486.
- BEVENISTE, E.N. 1997. Cytokines: influence on glial cell gene expression and function. *Neuroimmunoendocrinology*, 69, 31-75.

- BROSNAN, C.F. and RAINE C.S. 1996. Mechanisms of immune injury in multiple sclerosis. *Brain Pathol.* 6, 243-257.
- CANELLA, B. and RAINE, C.S. The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. *Ann. Neurol.*, 37, 424-435.
- CHUNG, Y., NORRIS, G., BENVENISTE, E.N. 1991. Differential tumor necrosis factor α expression by astrocytes from experimental allergic encephalomyelitis - susceptible and resistant rat strains. *J. Exp. Med.* 173, 801-811.
- CLAUDIO, L., RAINE, C.S. and BROSNAN, C.F. 1995. Evidence of persistent blood-brain barrier abnormalities in chronic-progressive multiple sclerosis. *Acta Neuropathol.* 90, 228-238.
- CONSTANTINESCU, C.S., HILLIARD, B., FUJIOKA, T., BHOPALE, M.K., CALIDA, S. and ROSTAMI, A.M. 1998. Pathogenesis of neuroimmunologic diseases. *Immunol. Res.*, 17, 217-227.
- DAS, M.P., NICHOLSON, L.B., GREER, J.M. and KUCHROO, V.K. 1997. Autopathogenic T helper cell type 1 (Th1) and protective Th2 clones differ in their recognition of the autoantigenic peptide of myelin proteolipid protein. *J. Exp. Med.* 186, 867-876.
- DE GROOT, J. 1991. *Neuroanatomia*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, pp.7-8.
- DE MARIA, R., LENTI, L., MALISAN, F., D'AGOSTINO, F., TOMASSINI, ZEUNER, A., RIPPO, M.R., TESTI, R. 1997. Requirement for GD3 ganglioside in CD95- and ceramide-induced apoptosis. *Science* 277, 1652-1665.

- DE VRIES, H.E., KUIPER, J., DE BOER, A.G., VAN BERKEL, J.C. and BREIMER, D. 1997. The blood-brain barrier in neuroinflammatory diseases. *Pharmacol. Rev.* 49, 143-155.
- DEIBLER, G.E., MARTENSON, R.E., and KIES, M.W. (1972) Large scale preparation of myelin basic protein from central nervous tissue of several mammalian species. *Prep. Biochem.* 2, 139-165.
- DOSMOROV, I.M., PROKHAZOVA, A.L., SVIRTSHEVSKAYA, E.V., LUTSAN, N.I., KOZIN, I.I., LEMENOVSKAYA, A.F., DYATLOVITSKAYA, E.V., and BERGELSON, L.D. 1997. Nanomolar concentrations of gangliosides stimulate primary humoral response. *Biochem. Mol. Biol. Intern.* 42, 57-63.
- DUCHEMIN, A.M., NEFF, N.H. and HADJICONSTANTINO, M. 1997. GM1 increases the content and mRNA of NGF in the brain of aged rats. *Neuroreport* 8, 3823-3827, 1997.
- DUMONTET, C., REBBAA, A., BIENVENU, J., PORTOUKALIAN, J. 1994. inhibition of immune cell proliferation and cytokine production by lipoprotein-bound gangliosides. *Cancer Immunol. Immunother.* 38, 311-316.
- ENCINAS, J.A., WEINER, H.L. and KUCHROO, V.K. 1996. Inheritance of susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neurosc. Res.* 45, 655-669.
- ENGELHARDT, B. 1996. The role of $\alpha 4$ -integrin in T lymphocyte migration into the inflamed and noninflamed central nervous system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 51-64.
- EWING, C. and BERNARD, C.C.A. 1998. Insights into the aetiology and pathogenesis of multiple sclerosis. *Immunol. Cell. Biol.* 76, 47-54.

- FREIER, S. 1990. The neuroendocrine-immune network. CRC Press, Boca Raton, p.164.
- GAROFALO, T., SORICE, M., MISASI, R., CINQUE, B., GIAMMATTEO, M., PONTIERI, G.M., CIFONE, M.G., and PAVAN, A. 1998. A novel mechanism of CD4 down-modulation induced by monosialoganglioside GM3. *J. Biol. Chem.* 273, 35153-35160.
- HAFLER, D.A., KENT, S.C., PIETRUSEWICZ, M.J., KHOURY, S.J., WEINER, H.L. and FAKAURA, H. 1997. Oral administration of myelin induces antigen-specific TGF- β 1 secreting T cells in patients with multiple sclerosis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 835, 120-131.
- GEHRMANN, J., MATSUMOTO, Y. and KREUTZBERG, G.W. 1995. Microglia: intrinsic immuneffector cell of the brain. *Brain Res. Rev.* 20, 269-287.
- HART, M.N. and FABRY, Z. 1995. CNS antigen presentation. *TINS*, 18, 475-481.
- HARTUNG, H.P., ARCHELOS, J.J., ZIELASEK, J., GOLD, R., KOLTZENBURG, M., REINERS, K.H. and TOYKA, K.V. 1995. Circulating adhesion molecules and inflammatory mediators in demyelination: a review. *Neurology* 45 (suppl 6), S22-45.
- IRANI, D.N., LIN, K. and GRIFFIN, D.E. 1996. Brain-derived gangliosides regulate the cytokine production and proliferation of activated T cells. *J. Immunol.* 157, 4333-4340.
- IWAHASHI, T., CHANG-SUNG, K., INOUE, A., INAGISAWA, N. 1997. Tumor necrosis factor- α and transforming growth factor production by isolated mononuclear cells from the spinal cords of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Tohoku J. Exp. Med.* 183, 123-133.

- KIEFER, R., SCHWEITZER, T., JUNG, S., TOYKA, K.V. and HARTUNG, H.P. 1998. Sequential expression of transforming growth factor- β 1 by T-cells, macrophages and microglia in rat spinal cord during autoimmune inflammation. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 57,385-395.
- KOIKE, T., FEHSEL, K., ZIELASEK, J., KOLB, H., BURKART, V. 1993. Gangliosides protect from TNF- α -induced apoptosis. *Immunol. Lett.* 35, 207-212.
- KORNER, H., LEMCKERT, F.A., CHAUDHRI, G., ETTELDORF, S. and SEDGWICK, J.D. 1997. Tumor necrosis factor blockade in actively induced experimental autoimmune encephalomyelitis prevents clinical disease despite activated T cell infiltration to the central nervous system. *Eur. J. Immunol.* 27, 1973-1981.
- KUCHROO, V.K. and WEINER, H.L. 1998. Antigen-driven regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Res. Immunol.* 149:, 759-771.
- LADISCH, S., LI, R. and OLSON, E. 1994. Ceramide structure tumor ganglioside immunosuppressive activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 1974-1978.
- LETTERIO, J.J. and ROBERTS, A.B. 1998. Regulation of immune responses by TGF- β . *Ann. Rev. Immunol.* 16, 137-161.
- LUDWIN, S.K. 1997. The pathobiology of the oligodendrocyte. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56(2), 111-124.
- LYNCH, S.G. and ROSE, J.W. 1996. Multiple Sclerosis. *Disease-a-Month*, XLIII, 1-56.

- MACEDO, H.Q., HAHN, M.D. and SANTOS, T.F.Q. 1996. Encefalomielite alérgica experimental. Modelo de doença inflamatória desmielinizante do SNC. Rev. Bras. Neurol. 32, 123-130.
- MASSA, P.T. 1993. Specific supression of major histocompatibility complex class I and class II in astrocytes by brain-enriched gangliosides. J.Exp. Med. 178,1357-1363.
- MATSUMOTO, Y., OHMORI, K. and FUJIWARA, M. 1992. Microglial and astroglial reactions to inflammatory lesions of experimental autoimmune encephalomyelitis in the rat central nervous system. J. Neuroimmunol. 37, 23-33.
- MILLER, S.D. and SHEVACH, E.M. 1998. Immunoregulation of experimental autoimmune encephalomyelitis. Res. Immunol. 149, 753-759.
- MIZUTAMARI, R.K., KREMER, L.J., BASILE, E.A. and NORES. G.A. 1998. Anti-GM1 ganglioside IgM-antibodies present in human plasma: affinity and biological activity changes in a patient with neuropathy. J. Neurosci. Res. 51, 237-242.
- MARTINO, G., GROHOVAZ, F., BRAMBILLA, E., CODAZZI, F., CONSIGLIO, A., CLEMENTI, E., FILIPPI, M., COMI, G. and GRIMALDI, L.M.E. 1998. Proinflammatory cytokines regulate antigen-indenpedent T-cell activation by two separate calcium-signaling pathways in multiple sclerosis patients. Ann. Neurol. 43, 340-349.
- NAMER, I.J., STEIBEL, J., POULET, P., MAUSS, Y., MOHR, M. and CHAMBRON, J. 1994. The role of Mycobacterium tuberculosis in experimental allergic encephalomiyelitis. Eur. Neurol. 34, 224-227.

- NAVIKAS, V. and LINK, H. 1996. Review: Cytokines and the pathogenesis of multiple sclerosis. *J. Neurosc. Res.* 45, 322-333.
- NOHARA, K., OZAWA, H., TAL, T., SAJI, H. and FUGIMAKI, H. 1997. Gangliosides involved in activation of rat T lineage cells. *Biochem. Biophys. Acta* 1345, 207-214.
- OFFNER, H., THIEME, T., VANDERBARK, A.A. 1987. Gangliosides induce selective modulation of CD4 from helper T lymphocytes. *J. Immunol.* 139, 3295-3305.
- OLSSON, T. 1995. Cytokine-producing cells in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Neurology* 45 (suppl 6), S11-S15.
- PEPEU, G., ODERFELD-NOWAK, B. and CASAMENTI, F. 1994. Pharmacology of gangliosides. *Prog. Brain Res.* 101, 327-335.
- PFEIFFER, S.E., WARRINGTON, A.E. and BANSAL, R. 1993. The oligodendrocyte and its many cellular processes. *TINS* 16, 191-197.
- PONZIN, D., MENEGUS, A.M., KIRSCHNER, G., NUNZI, G., FIORI, M.G. and RAINE, C.S. 1991. Effects of gangliosides on the expression of autoimmune demyelination in the peripheral nervous system. *Ann. Neurol.* 30, 678-685.
- RAINE, C.S. and PATH, F.R.C. 1994. The Dale E. McFarlin memorial lecture: The immunology of the multiple sclerosis lesion. *Ann. Neurol.* 36, S61-S72.
- RIECKMANN, P., ALBRECHT, B.A., KITZE, B., WEBER, T., HUMANI, H., BROOCKS, A., LÜER, W. and POSER, S. 1994. Cytokine mRNA levels in mononuclear blood cells from patients with multiple sclerosis. *Neurology*, 44, 1523-1526.

- SAEZ-TORRES, I., DIAZ-VILLOSLADA, P., MARTINEZ-CÁCERES, E., FERRER, I. and MONTALBAN, X. 1998. Gangliosides do not- elicit experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats and SJL mice. *J. Neuroimmunol.* 84, 24-29.
- SANTOS L.M.B., AL-SABBAGH, A., LONDONO, A. and WEINER, H.L. 1994. Oral tolerance to myelin basic protein induces regulatory TGF- β -secreting T cells in Peyer's patches of SJL mice. *Cell. Immunol.* 157, 439-447.
- SELMAJ, K., WALCZAK, A., MYCRO, M., BERKOWICZ, T., KOHNO, T. and RAINE, C.S. 1998. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis with a TNF binding protein (TNFbp) correlates with down-regulation of VCAM-1/VLA-4. *Eur. J. Immunol.* 28, 2035-2044.
- SMELTZ, R.B. and SWANBORG, R.H. 1998. Concordance and contradiction concerning cytokines and chemokines in experimental demyelinating disease. *J. Neurosc. Res.* 51, 147-153.
- TIEMEYER, M., SWANK-HILL, P., SCHNAAR, R.L. 1990. A membrane receptor for gangliosides is associated with central nervous system myelin. *J. Biol. Chem.* 265, 11990-11999.
- TRAN, E.H., HOEKSTRA, K., VAN ROOIJEN, N., DIJKSTRA, C.D., OWES, T. 1998. Immune invasion of the central nervous system parenchyma and experimental allergic encephalomyelitis, but not leukocyte extravasation from blood, are prevented in macrophage-depleted mice.

- TSUNODA, I. and FUJINAMI, R. 1996. Two models for multiple sclerosis: Experimental allergic encephalomyelitis and Theiler's murine encephalomyelitis virus. *J. Neurophatol. Exp. Neurol.* 55, 673-686.
- WEKERLE, H., KOJIMA, K., LANNES-VIEIRA, J., LASSMANN, H. and LININGTON, C. 1994. Animal models. *Ann. Neurol.* 36, S47-S53.
- WEKERLE, H., KOJIMA, K., LANNES-VIEIRA, J., LASSMANN, H. and LININGTON, C. 1994. Animal models. *Ann. Neurol.* 36, S47-S53.
- YIM, S.H., FARRER, R.G., HAMMER, J.A., YAVIN, E. and QUARLES, R.H. 1994. Differentiation of oligodendrocytes cultured from developing rat brain is enhanced by exogenous GM3 ganglioside. *J. Neurosci. Res.* 38, 268-281.
- ZHAO, B. and SCHWARTZ, J.P. 1998. Involvement of cytokines in normal CNS development and neurological diseases: recent progress and perspectives. *J. Neurosc. Res.* 52, 7-16.
- ZHOU, J., SHAO, H., COX, R.N., EWALD, S.J. 1998. Gangliosides enhance apoptosis of thymocytes. *Cell. Immunol.* 183, 90-98.
- ZIEGLER-HEITBROCK, H.W., KÄFFERLEIN, E., HÄAS, J.G., MEYER, N., STRÖBEL, M., WEBER, C., FLIEGER, D. 1992. Gangliosides suppress tumor necrosis factor production in human monocytes. *J. Immunol.* 148, 1753-1758.

Bibliografia de acordo com:

Harvard System - Journal of Neuroimmunology

Abreviações segundo List of Serial Title Word Abbreviations