



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



EFEITO DA ESTABILIZAÇÃO DE MASTÓCITOS NO DESENVOLVIMENTO DA ENCEFALOMIELTE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL

Karen Henriette Pinke

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do
título de Doutor no Programa de Pós-Graduação
em Biologia Geral e Aplicada, Área de
concentração *Biologia de parasitas e
microrganismos*.

Alexandrina Sartori

**BOTUCATU – SP
2017**



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**EFEITO DA ESTABILIZAÇÃO DE MASTÓCITOS NO
DESENVOLVIMENTO DA ENCEFALOMIELTE
AUTOIMUNE EXPERIMENTAL**

KAREN HENRIETTE PINKE

ALEXANDRINA SARTORI

VANESSA SOARES LARA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título
de Doutor no Programa de Pós-Graduação em
Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração
Biologia de parasitas e microrganismos.

Alexandrina Sartori

**BOTUCATU – SP
2017**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Pinke, Karen Henriette.

Efeito da estabilização de mastócitos no desenvolvimento da encefalomielite autoimune experimental / Karen Henriette Pinke. - Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Alexandrina Sartori
Coorientador: Vanessa Soares Lara
Capes: 20100000

1. Esclerose múltipla. 2. Encefalomielite autoimune experimental. 3. Mastócitos. 4. Cetotifeno.

Palavras-chave: encefalomielite autoimune experimental; esclerose múltipla; fumarato de cetotifeno; mastócitos.

Karen Henriette Pinke

**Efeito da estabilização de mastócitos no desenvolvimento da
encefalomielite autoimune experimental**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Alexandrina Sartori

Comissão examinadora

Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos
Faculdade de Odontologia de Bauru - USP

Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP

Prof. Dr. José Maurício Sforcin
Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP

Profa. Dra. Maria Terezinha Serrão Peraçoli
Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP

Botucatu, 08 de junho de 2017

DEDICATÓRIA

“Dedico este trabalho à energia que nos move diariamente em busca de uma evolução moral e espiritual. ”

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

a Deus e à vida em toda a sua plenitude por todos os momentos e circunstâncias vividas, os quais trouxeram-me a oportunidade de sentir, no meu interior, aquilo que é real e impulsionaram o desenvolvimento do meu caráter e a formação do meu Ser. Também agradeço por todas as vezes que sozinha, não me senti só e que, sem perceber, fui guiada.

a minha família e amigos. As palavras são dispensáveis para expressar a importância de vocês para mim. Não é preciso descrever aquilo que é real, pois a realidade é aquilo que experimentamos no nosso interior. Tudo o que vivemos juntos e aquilo que deixamos uns nos outros não precisa ser citado, apenas sentido.

a minha orientadora Alexandrina Sartori e coorientadora Vanessa Soares Lara. Agradeço, primeiramente, pela oportunidade e pelo empenho para que o meu doutorado se tornasse realidade. Agradeço também aos ensinamentos compartilhados e toda a dedicação com a minha formação profissional.

a equipe do laboratório de vacinas e imunomodulação por todos os momentos e ensinamentos compartilhados. Muito obrigada pelo empenho de todos durante a realização deste trabalho.

aos servidores, professores e colegas do departamento de Microbiologia e Imunologia, da seção de Pós-graduação e do Instituto de Biociências de Botucatu pelo acolhimento, boa convivência e todo o suporte técnico.

aos professores, servidores e amigos da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB-USP), em especial da disciplina de Patologia, por me acolherem com tanto carinho por todos estes anos.

a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por financiarem esta pesquisa através da concessão de bolsa de doutorado no âmbito do convênio FAPESP/CAPES (processo FAPESP nº 2014/00239-6). Este financiamento possibilitou que eu me dedicasse integralmente a este projeto e que eu expandisse meus horizontes através da participação em eventos científicos internacionais.

"Não sei se a vida é curta ou longa para nós. Mas sei que nada do que vivemos tem sentido, se não tocarmos o coração das pessoas. Muitas vezes basta ser: colo que acolhe, braço que envolve, palavra que conforta, silêncio que respeita, alegria que contagia, lágrima que corre, olhar que acaricia, desejo que sacia, amor que promove. E isso não é coisa de outro mundo, é o que dá sentido na vida. É o que faz com que ela seja nem curta, nem longa demais, mas que seja intensa, verdadeira, pura enquanto durar. Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina."

RESUMO

PINKE, K. H. **Efeito da estabilização de mastócitos no desenvolvimento da encefalomielite autoimune experimental.** 2017. 89p. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2017.

A Esclerose múltipla é uma doença autoimune degenerativa que acomete jovens adultos, causando danos neuroaxonais e áreas de desmielinização no sistema nervoso central (SNC) devido a uma resposta autoimune mediada por linfócitos Th1, Th17 e T citotóxicos. A encefalomielite autoimune experimental (EAE) constitui seu principal modelo de estudo e mastócitos parecem contribuir para os processos inflamatórios envolvidos na patogênese da EM/EAE. Seguindo este raciocínio, substâncias estabilizadoras de mastócitos, como o fumarato de cetotifeno, poderiam afetar o desenvolvimento destas doenças através do bloqueio dos processos de exocitose e desgranulação. O objetivo principal deste trabalho foi avaliar o efeito desta droga no desenvolvimento da EAE. Para isto, camundongos C57BL/6 fêmeas submetidas à indução da EAE através da imunização com MOG/CFA e injeção de toxina *pertussis*, foram tratados com fumarato de cetotifeno (0,4 mg/kg via intraperitoneal) durante 11 dias, a partir do 7º dia após a indução. O efeito do tratamento no desenvolvimento clínico da EAE foi determinado pela avaliação de peso corporal e escore clínico. Posteriormente, parâmetros histopatológicos e imunológicos associados à doença, bem como a quebra da função da barreira hematoencefálica (BHE) foram avaliados. As comparações dos valores de incidência, escores clínicos diários e máximos, e de variação de peso corpóreo revelaram que o tratamento com cetotifeno reduziu a incidência e a gravidade da EAE. Este efeito protetor determinado pelo cetotifeno foi associado com a normalização da função da BHE e consequente ausência ou redução da infiltração de linfócitos no SNC, e ativação reduzida de micróglia. Também se verificou menor expressão gênica de quimase-1, mMCP-4 e carboxipeptidase-1 no SNC e grande ativação da resposta imune periférica em amostras de linfonodos e baço dos animais imunizados e tratados com cetotifeno. Considerando os resultados obtidos, concluiu-se que o tratamento com fumarato de cetotifeno impede o desenvolvimento clínico da EAE por mecanismos que envolvem a manutenção da função da BHE e consequente bloqueio da infiltração de linfócitos no SNC.

Palavras-chave: esclerose múltipla; encefalomielite autoimune experimental; fumarato de cetotifeno; mastócitos.

ABSTRACT

PINKE, K. H. **Effect of mast cell stabilization on experimental autoimmune encephalomyelitis development**, 2017. 89p. Thesis (PhD) – Institute of Biosciences of Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2017.

Multiple sclerosis is one of the most prevalent neurological human diseases. It triggers axonal damage and demyelinated areas in central nervous system (CNS) by an autoimmune response mediated by Th1, Th17 and T cytotoxic lymphocytes. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is the most employed model of study this disease and mast cells appear to contribute to MS- and EAE- underlying immunopathogenesis. In this scenario, mast cell stabilizer drugs, such as ketotifen fumarate, could affect the development of these diseases by the blockage of exocytosis and degranulation. The aim of this study was to evaluate the effect of this drug on the development of EAE. For this, MOG/CFA-immunized female C57BL/6 mice were treated with ketotifen fumarate. The effect of treatment was determined by body weight loss and clinical score. Subsequently, EAE-associated histopathological and immunological parameters, as well as breakdown of blood-brain and blood-spinal cord barrier were analyzed. Comparisons about incidence values, daily and maximum clinical scores, and body weight loss revealed that ketotifen-treatment reduced the EAE-incidence and -severity. This protection was associated with the restoration of blood-spinal cord barrier function, absence or reduction of SNC lymphocytic infiltration and reduced microglial activation. Lower chymase-1, mMCP-4 and carboxypeptidase-1 gene expressions were also detected in the CNS, as well as higher activation of peripheral immune response in lymph node and splenic samples from immunized mice treated with ketotifen. Considering these results, it was concluded that the treatment with ketotifen fumarate prevents the clinical development of EAE by mechanisms related to maintenance of blood-spinal cord barrier function and consequent blockage of CNS-inflammatory infiltrate.

Keywords: multiple sclerosis; experimental autoimmune encephalomyelitis; ketotifen fumarate; mast cells.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 Esclerose múltipla: aspectos gerais e imunopatogênese.....	11
1.2 Encefalomielite autoimune experimental	16
1.3 Mastócitos: aspectos gerais e participação na EM/EAE.....	19
1.4 Racional científico	23
2 OBJETIVOS	24
3 MATERIAIS & MÉTODOS	26
3.1 Animais e indução da EAE.....	27
3.2 Avaliação clínica da EAE	28
3.3 Coleta do soro, SNC e órgãos linfoides secundários	29
3.4 Análise histopatológica.....	29
3.5 Obtenção de células de baço, linfonodos e SNC	30
3.6 Produção de citocinas por células de baço e linfonodos.....	30
3.7 Quantificação de subpopulações de linfócitos T, células dendríticas, micróglia e mastócitos por citometria de fluxo.....	31
3.8 Níveis de expressão de transcritos relacionados às subpopulações de linfócitos T auxiliares, mastócitos eIDO em linfonodos e/ou medula espinhal por RT-PCR.....	33
3.9 Ensaio de barreira hematoencefálica	35
3.10 Análise estatística.....	36
4 RESULTADOS	37
4.1 Desenvolvimento clínico da EAE.....	38
4.2 Resposta imune periférica.....	41
4.3 Alterações no sistema nervoso central.....	53
5 DISCUSSÃO	64
6 CONCLUSÃO	74
REFERÊNCIAS	76
ANEXO A - Aprovação do CEUA para o desenvolvimento da pesquisa.....	88
ANEXO B - Aprovação do CEEPA para o desenvolvimento da pesquisa	89

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Esclerose múltipla: aspectos gerais e imunopatogênese

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença neurológica crônica caracterizada pela presença de áreas de desmielinização (placas) nas substâncias branca ou cinzenta provocadas por uma resposta autoimune contra componentes do sistema nervoso central (SNC). Os fatores que efetivamente desencadeiam esta resposta autoimune são desconhecidos, porém, está bem estabelecido que estes fenômenos geram inflamação desmielinizante no cérebro e medula espinhal, dano e perda axonal, afetando a função dos nervos envolvidos. Como consequência, os portadores da EM vivenciam quadros de disfunções neurológicas que podem afetar consideravelmente sua capacidade física, bem como sua vida socioeconômica, uma vez que, em grande parte dos casos, a doença atinge jovens adultos (20-30 anos de idade), especialmente mulheres, numa fase decisiva para o desenvolvimento pessoal e profissional. Dentre as primeiras manifestações clínicas da EM estão fraqueza de um ou mais membros, perda de visão, falta de coordenação motora e parestesia (BROWNE et al., 2014; DAMAL; STOKER; FOLEY, 2013; DENDROU; FUGGER; FRIESE, 2015; GRIGORIADIS; VAN PESCH; PARADIG, 2015; HOHLFELD, 2010).

As manifestações clínicas da EM e a dinâmica temporal do aparecimento dos sintomas são heterogêneos, porém existem classificações baseadas nestas características que tentam abranger os diversos quadros clínicos já observados. A EM recorrente-remittente (EM-RR) é a forma clínica que acomete a maior parte dos portadores (cerca de 85%) (DENDROU et al., 2015). Nesta condição, o portador apresenta quadros transitórios de disfunção neurológica (surtos), seguidos de períodos de recuperação dos sintomas (remissão). Em muitos casos, o acúmulo de lesões irreversíveis no SNC durante os surtos e a neurodegeneração agravam os sintomas. Como consequência, uma ou duas décadas depois do episódio inicial, cerca de 80 % dos portadores de EM-RR desenvolvem um segundo quadro clínico conhecido como fase secundária progressiva (EM-SP). Uma pequena parcela dos portadores de EM vivenciam o agravamento de sua condição clínica desde o episódio inicial da doença. Nestes casos, não são observados períodos de remissão. Esta condição é chamada de EM primária progressiva (EM-PP) (DENDROU et al., 2015; GRIGORIADIS et al., 2015).

A prevalência da EM na população mundial é outro dado preocupante. Segundo o atlas da esclerose múltipla de 2013 (BROWNE et al., 2014), o número estimado de portadores da EM passou de 2,1 milhões em 2008 para 2,3 milhões de pessoas afetadas mundialmente em 2013. Parte deste aumento foi atribuída à otimização dos métodos diagnósticos e coleta de

dados epidemiológicos. O aumento da expectativa de vida da população em geral e dos portadores da EM também são fatores que, possivelmente, contribuíram para este acréscimo (BROWNE et al., 2014). Regionalmente, América do Norte e parte da Europa são os locais com maior prevalência da EM; mais de 100 casos a cada 100.000 habitantes. No Brasil, estima-se 5,01-20 casos a cada 100.000 habitantes, variando de acordo com a região demográfica do país (COMINI-FROTA et al., 2013; VASCONCELOS et al., 2016).

Atualmente, não há cura para a EM. Os tratamentos disponíveis baseiam-se em drogas imunossupressoras e imunomoduladoras que interferem ou suprimem os mecanismos envolvidos na resposta autoimune, visando reduzir a frequência e a gravidade dos episódios da doença na sua forma recorrente-remitente. Entre os imunossupressores destacam-se: azatioprina, ciclofosfamida, mitoxantrona, metotrexato e ciclosporina. Para o tratamento dos surtos, utiliza-se a pulsoterapia (administração de altas doses de medicamentos por curtos períodos de tempo) com corticoides sintéticos, sendo a metilprednisolona o mais comumente utilizado. Dentre as drogas imunomoduladoras estão o interferon- β , acetato de glatiramer, fingolimod e anticorpos humanizados, como natalizumab que interfere na migração celular do sistema circulatório periférico para o SNC, e o alemtuzumab que induz linfopenia através de citotoxicidade dependente de anticorpos (COCLITU; CONSTANTINESCU; TANASESCU, 2016). A eficácia destas substâncias é variável e depende da resposta e adesão pelo paciente. Efeitos colaterais importantes tais como palpitações, ansiedade, dispneia, urticária, sintomas semelhantes aos da gripe e aparecimento de tumores ou problemas cardíacos, têm sido descritos (COCLITU et al., 2016; DAMAL et al., 2013; STUVE et al., 2008).

Até recentemente, não existia nenhuma droga aprovada com atuação específica no tratamento das condições progressivas da EM. Em geral, as terapias disponíveis não interferem, substancialmente, na progressão do dano e da perda neuroaxonal que levam à atrofia do cérebro observada nos portadores de EM-SP ou -PP. Essa resposta diferencial aos tratamentos reforça a hipótese de que diferentes mecanismos medeiam as respostas inflamatórias características dos surtos e dos danos neuroaxonais evidentes nas fases progressivas da EM (COCLITU et al., 2016; DENDROU et al., 2015). No entanto, em 28 de março de 2017, a *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o ocrelizumab como a primeira droga imunomoduladora indicada para o tratamento da EM-PP <<https://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm549325.htm>>. O ocrelizumab é um anticorpo humanizado específico para a molécula CD20 que atua sobre os linfócitos B em diferentes estágios de maturação e poupa células negativas para este marcador, como plasmócitos produtores de anticorpos. Desse modo, os efeitos benéficos do ocrelizumab

parecem estar mais relacionados com a redução da produção de citocinas e da apresentação antigênica pelos linfócitos B do que com alterações na produção de anticorpos patogênicos. Três estudos clínicos de fase III estavam testando a ação desta droga e os resultados demonstraram redução na frequência anual de recidiva em portadores de EM-RR e redução da progressão clínica e das lesões avaliadas por ressonância magnética em portadores de EM-PP (HOHLFELD; MEINL, 2017).

A etiologia desta doença é complexa e pouco entendida. Predisposição genética e fatores ambientais são considerados importantes para o início e curso da EM (ASCHERIO, 2013; AXISA; HAFLER, 2016; ROTHHAMMER; QUINTANA, 2016). Agentes infecciosos e seus produtos estão entre estes fatores externos que podem influenciar o desenvolvimento desta doença (GILDEN, 2005; MARRIE, 2004). Por exemplo, grande porcentagem de pacientes com EM apresenta anticorpos para o vírus Epstein-Barr, em alguns estudos chegando a um percentual de 100 % (LOSSIUS et al., 2012). Outro fator ambiental associado com a incidência de EM é a exposição solar que, interessantemente, demonstra uma correlação inversa com a doença, ou seja, diminuição do risco de seu desenvolvimento com uma maior exposição do indivíduo à luz do sol (MILO; KAHANA, 2010). Esse efeito tem sido atribuído à ação da luz UVB na conversão da molécula 7-deidrocolesterol, presente nas camadas profundas da epiderme, em pré-vitamina D₃ e, posteriormente, em vitamina D₃. A vitamina D (VitD₃) tem sido implicada como um agente protetor frente às doenças infecciosas como a tuberculose, mas também nas doenças alérgicas e nas autoimunes como a EM (PLUDOWSKI et al., 2013; YANG et al., 2013).

O local onde a resposta autoimune é desencadeada representa outra importante questão a ser desvendada na etiologia da EM. Uma das hipóteses mais aceitas postula a ocorrência de ativação periférica de linfócitos T autorreativos, possivelmente ocasionada por reações cruzadas de células específicas para peptídeos virais ou microbianos (mimetismo molecular), junto com uma quebra da tolerância periférica. Estes linfócitos migrariam para o interior do SNC, junto de outras células como linfócitos B e monócitos, estabelecendo a neuroinflamação. Esta dinâmica é observada na encefalomielite autoimune experimental (EAE), modelo amplamente utilizado para o estudo dos mecanismos imunopatológicos envolvidos na EM. Diferentemente, outra hipótese considera que eventos intrínsecos ao SNC, como infecções virais e traumas, liberariam antígenos sequestrados, desencadeando a neuroinflamação, possivelmente através da apresentação destes antígenos a linfócitos circulantes no espaço subaracnoidal ou devido ao escape destes peptídeos através dos fluidos drenados do SNC. Nestes casos, a migração de linfócitos T autorreativos aconteceria de forma secundária. É

possível notar que, em ambas as hipóteses, fatores ambientais teriam papel crucial na ativação da resposta autoimune em conjunto com fatores genéticos ligados à quebra da tolerância periférica (DENDROU et al., 2015; LASSMANN; BRADL, 2017).

Evidências recentes sugerem também que a microbiota intestinal pode contribuir com as doenças neurológicas, incluindo a EM (TREMLET et al., 2017). Segundo este conceito que está se delineando, um perfil pró-inflamatório intestinal associado com o acúmulo de linfócitos T autorreativos no tecido linfático do intestino desencadearia, juntamente com fatores genéticos predisponentes, estas patologias inflamatórias envolvendo o SNC (WEKERLE, 2016). Estudos mostrando disbiose em pacientes com EM e associação entre composição da microbiota e desenvolvimento de EAE dão suporte a esta possível correlação (GLENN; MOWRY, 2016).

Embora os fenômenos envolvidos na imunopatogênese da EM não estejam completamente elucidados, a importância da neuroinflamação nesses processos está consolidada. Independente de uma ativação da resposta autoimune intrínseca ou extrínseca ao SNC, as células inflamatórias adentram os tecidos nervosos através da barreira hematoencefálica (BHE) ou do fluido cefalorraquidiano no plexo coroide e estabelecem o infiltrado inflamatório no parênquima do órgão e nas regiões de leptomeninges (DENDROU et al., 2015). Esta infiltração de células inflamatórias nos tecidos do SNC é detectada em todos os estágios e formas clínicas da EM, de modo mais pronunciado na fase aguda ou lesões ativas e na EM-RR (FRISCHER et al., 2009). Em especial, nas meninges de pacientes com EM-SP são encontradas estruturas linfoides terciárias formadas por agregados de plasmócitos, linfócitos B, T e células dendríticas foliculares. Já nas meninges de pacientes com a forma primária progressiva da EM observa-se infiltrado difuso sem a presença destas estruturas especializadas (DENDROU et al., 2015; GRIGORIADIS et al., 2015; LASSMANN; BRADL, 2017).

Diversos tipos celulares estão envolvidos na imunopatogênese da EM e isto fica evidente quando terapias que afetam leucócitos em geral melhoram a progressão da doença (COLES et al., 2006; ELIEH-ALI-KOMI; CAO, 2016; LASSMANN; BRADL, 2017). Análises de lesões de EM sugerem que linfócitos T citotóxicos ($CD8^+$) e B possuem proeminentes papéis na neuroinflamação devido à abundância de linfócitos T $CD8^+$ em relação à linfócitos T $CD4^+$ ou T auxiliares em lesões ativas (BABBE et al., 2000; FRISCHER et al., 2009), bem como de plasmócitos secretando anticorpos em lesões de pacientes com EM-SP ou -PP (FRISCHER et al., 2009). O sucesso do tratamento de pacientes com diferentes formas clínicas da EM com ocrelizumab também reforça a importante participação de linfócitos B na imunopatogênese da doença que, neste caso, parece estar mais relacionada com a capacidade dessas células em apresentar antígenos (HOHLFELD; MEINL, 2017). Isto não descarta a

participação de linfócitos T CD4⁺ na imunopatogênese da doença humana, a qual parece estar mais envolvida com os processos inflamatórios iniciais (DENDROU et al., 2015; LASSMANN; BRADL, 2017). Dentre os linfócitos T CD4⁺, estudos principalmente desenvolvidos com a EAE destacam a importância de linfócitos Th1 e Th17, subtipos de linfócitos T auxiliares caracterizados pela produção das citocinas IFN- γ e IL-17, respectivamente (DENDROU et al., 2015; FLETCHER et al., 2010; LEGROUX; ARBOUR, 2015). No entanto, a importância relativa de cada um destes subtipos de linfócitos e das citocinas relacionadas é controversa no contexto da EM. Embora a mudança de perfil destas subpopulações de linfócitos para um fenótipo Th2 seja considerada como o mecanismo protetor induzido pelo tratamento com IFN- β (KOZOVSKA et al., 1999), a falha no tratamento com ustekinumab, um anticorpo contra a subunidade p40 presente nas citocinas IL-12 e IL-23, importantes no desenvolvimento das respostas Th1 e Th17, respectivamente, pode estar relacionada com uma reduzida participação destas citocinas e subtipos de linfócitos em estágios mais tardios da EM (MARTIN, 2008; SEGAL et al., 2008). Contudo, as citocinas IFN- γ e IL-17, juntamente com TNF- α e IL-6, parecem ter papel importante no processo inflamatório e subsequente degeneração axonal, morte dos oligodendrócitos e disfunção neuronal (DENDROU et al., 2015; FURUZAWA-CARBALLEDA; VARGAS-ROJAS; CABRAL, 2007; SOSPEDRA; MARTIN, 2005). Além disso, são encontradas células CD4⁺ expressando, concomitantemente, IFN- γ e IL-17, bem como linfócitos T CD8⁺ produtores de IL-17, principalmente em lesões ativas, nas quais muitos linfócitos T CD4⁺ também são positivos para IL-17 (TZARTOS et al., 2008).

No parênquima do órgão ocorre a ativação de micróglia e astrócitos, células residentes do SNC, as quais, juntamente com os macrófagos, permanecem ativados na fase crônica da doença (DENDROU et al., 2015; LASSMANN; BRADL, 2017). Micróglia e macrófagos encontrados no SNC são células imunes que compartilham aspectos morfológicos e marcadores moleculares, porém com origens distintas. Em humanos, progenitores mielóides povoam o SNC durante o desenvolvimento fetal e dão origem às micróglia, encontradas somente nos tecidos nervosos. Já os macrófagos encontrados no SNC são originados de monócitos circulantes que infiltram os tecidos nervosos após dano tecidual. Como estas células compartilham a expressão de alguns marcadores, a identificação destes tipos celulares nos tecidos nervosos baseia-se, rotineiramente, no nível de expressão de CD45. Células do sistema imunológico infiltrantes no tecido-alvo expressam altos níveis de CD45, enquanto que micróglia são CD45^{low}.

Recentemente, foi descoberto o marcador Tmem119, expresso somente em micróglias de humanos e camundongos (BENNETT, M. L. et al., 2016; DAVIES; MIRON, 2016).

A imunopatogênese da EM também tem sido atribuída a defeitos na atividade funcional de linfócitos T reguladores (Tregs). Essas células são importantes não apenas para a manutenção da tolerância periférica, mas também para controlar a autoimunidade órgão-específica através da supressão de células T autorreativas (TANG et al., 2004). Alguns trabalhos têm demonstrado redução da frequência e da atividade supressora dessas células e de subtipos específicos, como CD39⁺, em pacientes com EM (PROCACCINI et al., 2015). Estes defeitos podem estar associados à reduzida frequência de Tregs *naïve* circulantes (CD45RA⁺CD31⁺), expansão insuficiente de Tregs de memória ou mudança fenotípica de Tregs para células Th1-like secretoras de IFN- γ . Além disso, pode haver uma resistência das células efetoras aos mecanismos de supressão (DENDROU et al., 2015; FLETCHER et al., 2010; HAAS et al., 2005; HUAN et al., 2005; VENKEN et al., 2008).

Associados aos fenômenos inflamatórios, observam-se redução da mielina e dano axonal com conseqüente atrofia das substâncias branca e cinzenta (GRIGORIADIS et al., 2015; LASSMANN; BRADL, 2017). Outras características histopatológicas clássicas da EM incluem a morte de oligodendrócitos e presença de gliose, que se caracteriza por aumento do número de células da glia na substância branca (EDWARDS et al., 2011).

1.2 Encefalomielite autoimune experimental

A encefalomielite autoimune experimental (EAE) é uma doença inflamatória desmielinizante induzida em diferentes vertebrados através da sensibilização com antígenos provenientes do SNC emulsificados em adjuvante completo de Freund (CFA). Em camundongos, para que a doença se desenvolva é, geralmente, necessária a inoculação de toxina *pertussis*. Dentre os possíveis efeitos desta toxina estão a inibição da anergia periférica, supressão da atividade das Tregs, indução de IL-6 e IL-1 β e aumento da permeabilidade da BHE (BILLIAU; MATTHYS, 2001; DUMAS et al., 2014; LASSMANN; BRADL, 2017; LINTHICUM; MUNOZ; BLASKETT, 1982; RONCHI et al., 2016; ROY et al., 2012). A EAE também pode ser induzida passivamente através da transferência adotiva de linfócitos específicos para antígenos do SNC de um animal doador para um receptor. No entanto, mesmo nestes casos, a sensibilização ativa é etapa fundamental, uma vez que é por meio dela que os linfócitos encefalitogênicos que serão transferidos de um animal doador para um receptor serão estimulados a proliferar (KAWAKAMI et al., 2012; LASSMANN; BRADL, 2017).

Devido às semelhanças com a patogênese da EM, a EAE tem sido considerada um modelo experimental da doença humana. No entanto, nenhum protocolo de indução da EAE consegue reproduzir integralmente os fenômenos observados na EM e as características clínicas e moleculares do modelo variam de acordo com o protocolo de sensibilização e com as características genéticas do animal utilizado (PROCACCINI et al., 2015). Embora seja uma desvantagem não reproduzir integralmente os fenômenos observados na EM, a diversidade de quadros clínicos que podem ser gerados através da indução da EAE é um aspecto interessante, uma vez que permite a escolha do modelo mais adequado para os objetivos do estudo, além de constituir uma fonte mais acessível de tecido nervoso afetado, um desafio no estudo da EM, o qual é principalmente baseado em biópsias e imagens de ressonância magnética (FLETCHER et al., 2010; LASSMANN; BRADL, 2017; PROCACCINI et al., 2015). Protocolos de sensibilização ativa envolvendo camundongos, ratos, cobaias ou primatas geram inflamação e placas de desmielinização, as quais podem ser primárias semelhantes às observadas nas lesões da EM, ou secundárias devido à degeneração axonal (LASSMANN; BRADL, 2017). Dentre estes, a imunização de camundongos com peptídeo da glicoproteína de mielina de oligodendrócitos (MOG₃₅₋₅₅) emulsificados em CFA, associada à inoculação de toxina *pertussis*, constitui um dos modelos mais utilizados, principalmente para estudos dos mecanismos moleculares, da participação de diferentes células imunes e também para testes de terapias imunomoduladoras ou imunossupressoras (LASSMANN; BRADL, 2017; PROCACCINI et al., 2015). Este protocolo de indução da EAE gera uma doença inflamatória aguda ou crônica na medula espinhal mediada principalmente por linfócitos T auxiliares com a participação de linfócitos T citotóxicos. Clinicamente é caracterizada por alterações motoras que podem levar à paraplegia dos animais. Histopatologicamente, observa-se presença de infiltrado inflamatório mononuclear e degeneração axonal com desmielinização, principalmente secundária, alterações que são mais evidentes na medula espinhal do que nos tecidos cerebrais (LASSMANN; BRADL, 2017). Outros modelos envolvendo indução passiva, toxinas, infecções virais e animais transgênicos que expressam moléculas humanas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) ou que, sob determinadas condições, desenvolvem espontaneamente a EAE devido a presença de receptores nos linfócitos T que reconhecem antígenos cerebrais, também são desenvolvidos de acordo com os objetivos do estudo (FLETCHER et al., 2010; LASSMANN; BRADL, 2017).

Como citado, a resposta inflamatória induzida na EAE é principalmente mediada por linfócitos T auxiliares específicos para o antígeno utilizado na sensibilização (CHENG et al., 2017; FLETCHER et al., 2010). Este aspecto está possivelmente relacionado com as diferenças

clínicas e histopatológicas observadas em relação à EM, na qual linfócitos T citotóxicos e B, além de macrófagos, parecem desenvolver papéis mais contundentes na imunopatogênese da doença humana (LASSMANN; BRADL, 2017). Em relação à EAE, estudos acerca da participação de linfócitos T citotóxicos e B são menos numerosos que aqueles direcionados aos linfócitos T auxiliares e modelos de indução da EAE direcionados para o estudo destas células são escassos (LASSMANN; BRADL, 2017).

Estudos envolvendo transferência adotiva de clones Th1 específicos destacam a importância destas células e das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e TNF- α no desenvolvimento de uma EAE grave (FLETCHER et al., 2010; KLINKERT et al., 1997; LOVETT-RACKE; YANG; RACKE, 2011; SOSPEDRA; MARTIN, 2005). Além disso, camundongos *knockout* de T-bet, fator de transcrição relacionado com a diferenciação de linfócitos Th1, imunizados com MOG foram resistentes ao desenvolvimento da EAE (BETTELLI et al., 2004). Neste contexto, células Th17 também parecem desempenhar um papel crítico na patogênese da EAE, principalmente nos eventos patológicos iniciais (ARANAMI; YAMAMURA, 2008; ROSTAMI; CIRIC, 2013; WOJKOWSKA et al., 2014). Por exemplo, animais deficientes em IL-17 desenvolvem EAE mais tardiamente e com sintomatologia mais branda (KOMIYAMA et al., 2006). Tem sido constatada a participação destas células na ruptura da BHE e na dinâmica de infiltração de células T, a qual ocorre quando existe predominância de células Th17 em relação às Th1 (HUPPERT et al., 2010; MURPHY et al., 2010; WOJKOWSKA et al., 2014). O fato de células Th17 específicas para mielina também determinarem o desenvolvimento de EAE por transferência adotiva de células comprovam também sua participação na EAE (FLETCHER et al., 2010; KOMIYAMA et al., 2006; MURPHY et al., 2010; ROSTAMI; CIRIC, 2013).

Após a ativação periférica dos linfócitos Th autorreativos, estas células migram através do sistema circulatório para regiões intimamente ligadas ao SNC, como as meninges, antes de adentrarem o parênquima do tecido. Tem sido proposto um modelo de 2 etapas para explicar a entrada de linfócitos autorreativos no SNC. Inicialmente, estas células adentrariam o plexo coroide, região altamente vascularizada localizada nos ventrículos e responsável pela produção do líquido cefalorraquidiano. Nesta região alguns linfócitos autorreativos adentrariam o parênquima do plexo coroide através de capilares fenestrados e, subsequentemente atingiriam o líquido cefalorraquidiano e o espaço subaracnoidal através das células epiteliais (LOPES PINHEIRO et al., 2016). Neste percurso os linfócitos seriam reestimulados por células imunes residentes como células dendríticas (DCs) e mastócitos (LOPES PINHEIRO et al., 2016; WALKER-CAULFIELD; HATFIELD; BROWN, 2015). Posteriormente ocorreria então a

segunda etapa na qual a inflamação nas meninges causada pela liberação de mediadores na região pelas células infiltrantes e residentes facilitaria a entrada massiva de células pela BHE (RUSSI; BROWN, 2015; WALKER-CAULFIELD et al., 2015). A BHE é a estrutura especializada que forma grande parte da interface entre o sistema circulatório e o SNC garantindo a homeostase dos tecidos e órgãos deste sistema através de uma alta seletividade em relação ao transporte de substâncias e células para o SNC. Esta estrutura é composta por células endoteliais especializadas, pericitos e astrócitos que interagem entre si e com outras células residentes do SNC como neurônios e células da imunidade, como os mastócitos, através de diversas moléculas e sistemas enzimáticos para garantir o controle deste transporte (BANKS, 2016; VARATHARAJ; GALEA, 2017). A inflamação é um processo capaz de afetar a função normal da BHE, promovendo um aumento da permeabilidade desta estrutura. Como citado, esta quebra da função da BHE é um importante evento na imunopatogênese da EM e da EAE (LOPES PINHEIRO et al., 2016; SCHENK; DE VRIES, 2016). A atração de neutrófilos através da produção de TNF- α por mastócitos e a liberação de mediadores, enzimas e espécies reativas do oxigênio por estas células é um exemplo de mecanismo de quebra da BHE que foi observado na imunopatogênese da EAE (CHRISTY et al., 2013; RODRIGUES; GRANGER, 2015).

No parênquima do SNC, os linfócitos autorreativos e macrófagos infiltrantes interagem com células residentes, como as micróglias, oligodendrócitos e neurônios, estimulando a neuroinflamação e causando desmielinização primária ou secundária e dano neuroaxonal (CHENG et al., 2017; FLETCHER et al., 2010; WALKER-CAULFIELD et al., 2015).

1.3 Mastócitos: aspectos gerais e participação na EM/EAE

Inicialmente, acreditava-se que os mastócitos eram importantes somente nas reações alérgicas e como gatilho dos fenômenos vasculares da inflamação. Entretanto, a participação destas células nas infecções e doenças autoimunes vem sendo ressaltada (BROWN; HATFIELD, 2012; TAYLOR; METCALFE, 2001). Os mastócitos estão amplamente distribuídos no organismo, inclusive no SNC, principalmente próximo das meninges e da BHE (NELISSEN et al., 2013; SILVER; CURLEY, 2013). Estas células possuem grande plasticidade fenotípica, adequando-se ao ambiente e, desta forma, sendo distinguidas em subpopulações devido à sua localização ou ao conteúdo de seus grânulos intracitoplasmáticos (MOON et al., 2010; SILVER; CURLEY, 2013).

No contexto da presente pesquisa, inúmeras evidências relacionadas à ação dos mastócitos sobre componentes do SNC e regulação da resposta imune embasam os estudos

sobre sua participação na patogênese da EM/EAE (CONTI; KEMPURAJ, 2016). Tem sido descrito que diversos mediadores estocados nos grânulos ou sintetizados *de novo* pelos mastócitos possuem atividade sobre o SNC (NELISSEN et al., 2013; SILVER; CURLEY, 2013). Histamina, TNF- α , IL-6 e fator de crescimento neural são exemplos destes mediadores que causam, entre outros efeitos, modulação da permeabilidade da BHE, recrutamento de neutrófilos, regulação da atividade microglial e promoção de sobrevivência e diferenciação de neurônios (COSTANZA; COLOMBO; PEDOTTI, 2012; NELISSEN et al., 2013; SILVER; CURLEY, 2013). Esses mediadores podem atuar nas células do SNC através de sua liberação por desgranulação ou pelo fenômeno denominado transgranulação (transferência dos grânulos por emissão de pseudópodos que se ligam na membrana da célula adjacente). A transgranulação tem sido descrita como responsável pela presença de mediadores de mastócitos no citoplasma de neurônios (NELISSEN et al., 2013; WILHELM; SILVER; SILVERMAN, 2005). Especificamente com relação à histamina, estudo recente demonstrou a ação regulatória deste mediador sobre as respostas de células T, a produção de citocinas por células apresentadoras de antígenos, a permeabilidade da BHE e a atividade de Tregs (SALIGRAMA et al., 2013). Evidências também sugerem uma participação direta dos mastócitos na degradação da mielina (AMOR; WOODROOFE, 2014; KARAGKOUNI; ALEVIZOS; THEOHARIDES, 2013).

Com relação à modulação local da resposta imune, mastócitos produzem IL-23, TGF- β e IL-6, importantes para o desenvolvimento das respostas Th17 (CHEN, G.; SHANNON, 2013), além da IL-12, essencial para a diferenciação de linfócitos Th1 (GREGORY et al., 2005; SAYED; BROWN, 2007) e IL-4, importante na imunidade humoral (HERSHKO; RIVERA, 2010). Considerados por alguns autores como células apresentadoras de antígenos (APC), mastócitos também poderiam reativar localmente linfócitos que migraram para regiões importantes na patogênese da EAE, como meninges e parênquima do SNC, através da interação celular direta (BROWN; HATFIELD, 2012; MOON et al., 2010; SILVER; CURLEY, 2013). Dentre as moléculas participantes destas interações e expressas em mastócitos estão ICAM-1 (CD54), ICOS-L, PD-L1, PD-L2, OX40L, CD153, Fas, CD40L, CD80, CD86, MHC de classe I e II (HERSHKO; RIVERA, 2010). Considerando este potencial inflamatório dos mastócitos, estudos focando a participação destas células na EM/EAE vêm sendo desenvolvidos.

Grande parte das evidências científicas apontam para uma participação ativa na patogênese destas doenças, enquanto que poucos estudos reportam ausência de participação dos mastócitos ou atuação protetora/reguladora dos processos inflamatórios e de lesão no SNC (BENNETT, J. L. et al., 2009; CONTI; KEMPURAJ, 2016; ELIEH-ALI-KOMI; CAO, 2016; NELISSEN et al., 2013). A presença de mastócitos nas lesões de pacientes com EM já vem

sendo descrita, bem como seu aumento próximo aos sítios de inflamação desmielinizante em pacientes com EM e em roedores com EAE. Foram também observados níveis elevados de triptase e histamina no fluido cérebro-espinhal de pacientes com EM (BROWN; HATFIELD, 2012; WALKER; HATFIELD; BROWN, 2012). Nas lesões de EAE em roedores, foram detectados aumento da desgranulação de mastócitos e elevados níveis de suas proteases (SILVER; CURLEY, 2013). De fato, a interação entre mastócitos e linfócitos na EAE parece causar a proliferação local de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e suprimir Tregs, o que contribuiria para o desenvolvimento da EAE e possivelmente da EM (HERSHKO; RIVERA, 2010; HONG et al., 2015). Em contrapartida, tratamentos que culminaram no recrutamento de Tregs para o SNC determinaram redução da gravidade da EAE, o que foi associado com inativação de rotas secretoras de mastócitos via eixo OX40/OX40L e supressão da migração destas células para o SNC através da diminuição da expressão de CCL2/CCR2, V-CAM-1 e PECAM-1 (HONG et al., 2013). Experimentos envolvendo camundongos *knockout* para mastócitos demonstraram, em sua maioria, uma diminuição da gravidade da doença, a qual pode ser restabelecida pelo repovoamento seletivo com mastócitos gerados a partir de células-tronco medulares (SILVER; CURLEY, 2013).

Evidências recentes sugerem uma participação relevante dos mediadores produzidos por estas células nos fenômenos iniciais da patogênese da EAE. A liberação de TNF- α por mastócitos presentes nas meninges parece ser fundamental para o recrutamento de neutrófilos, os quais induzem a permeabilização da BHE (CHRISTY et al., 2013; WALKER-CAULFIELD et al., 2015). Outras evidências indicam que a IL-1 β produzida de maneira dependente de caspase-1 por mastócitos residentes nas meninges de animais com EAE induz a expressão de GM-CSF em linfócitos T autorreativos, condição que foi associada com a capacidade dos linfócitos adentrarem o SNC. Neste mesmo estudo, os autores destacam que a co-localização de mastócitos e linfócitos T foi observada em lesões de portadores de EM em fase aguda. Este aspecto sugere uma possível interação entre estas células na doença humana (RUSSI; WALKER-CAULFIELD; GUO; et al., 2016).

Substâncias inibidoras de atividade dos mastócitos também têm mostrado ação sobre sinais clínicos da EAE ou eventos neuroinflamatórios, e podem representar estratégias terapêuticas em processos inflamatórios com atuação evidente destas células (COSTANZA et al., 2012; DIMITRIADOU; PANG; THEOHARIDES, 2000). A administração de proxicrimil 3 dias após a indução da EAE por transferência adotiva preveniu o aparecimento dos sinais clínicos (DIETSCH; HINRICHS, 1989). Em outro estudo, o tratamento oral com hidroxizina reduziu a gravidade da EAE (DIMITRIADOU et al., 2000). A injeção de cromoglicato de sódio

no hipotálamo foi capaz de inibir a ativação da micróglia induzida pela inoculação do composto 48/80, um secretagogo com ação sobre mastócitos, e reduziu a produção de citocinas (DONG et al., 2017). Outro exemplo deriva de um modelo de isquemia cerebral focal, no qual a administração intraventricular de cromoglicato de sódio reduziu a quebra da BHE, o edema cerebral e a infiltração de neutrófilos no SNC (MCKITTRICK; LAWRENCE; CARSWELL, 2015).

Entre as drogas que possuem atividade sobre mastócitos, o fumarato de cetotifeno (cetotifeno), comumente empregado no tratamento de doenças alérgicas humanas, é uma droga anti-histamínica de segunda geração e um forte estabilizador de mastócitos (BABA et al., 2016; FINN; WALSH, 2013; KABRA et al., 2000; WADE; BIELORY; RUDNER, 2012). Através da prevenção da deformação da membrana plasmática e do influxo de cálcio, o cetotifeno inibe a degranulação de mastócitos, bem como a exocitose de mediadores produzidos *de novo*. Além disso, esta droga exibe ação antifosfatidilsterase, impedindo a síntese de prostaglandinas e leucotrienos (BABA et al., 2016; CRAPS; NEY, 1984; MONUMENT et al., 2015; WADE et al., 2012). Efeitos sobre outros fenômenos e tipos celulares não podem ser descartados. A ação do cetotifeno sobre diferentes mecanismos inflamatórios e tipos celulares foi pouco estudada. Em alguns relatos, não é possível afirmar se alterações causadas por esta droga decorreram de um efeito direto nos mecanismos estudados ou indireto através da modulação de mastócitos. Hui e Yu em 1986, demonstraram que o cetotifeno induz aumento dos níveis de AMP cíclico em linfócitos e relacionaram este fenômeno com o efeito profilático observado na asma. Por outro lado, doses de até 10 μ M de cetotifeno não afetaram a proliferação e migração de linfócitos T e a produção de IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, TNF- α e IFN- γ por estas células (HUI; YU, 1987). Em macrófagos também não foram observadas alterações dependentes do cetotifeno na produção de IL-6 e TNF- α (NORI et al., 2003). Snyman e colaboradores (1992) observaram diminuição de infiltrado de basófilos, eosinófilos e linfócitos na pele de pacientes atópicos tratados com cetotifeno (SNYMAN et al., 1992). Efeito protetor do cetotifeno também foi observado em um modelo de enterocolite (POTHOULAKIS et al., 1993). Redução da inflamação do epitélio e necrose foram associados com diminuição da secreção de mediadores por mastócitos e neutrófilos: leucotrienos, fator ativador de plaqueta e protease 4 de mastócitos (POTHOULAKIS et al., 1993). Em células tumorais, o cetotifeno afetou a migração e a invasão *in vitro*, e suprimiu a expressão de moléculas envolvidas com estes fenômenos (CDC42, Rac e Rho) (KIM, H. J. et al., 2014). *In vivo*, observou-se que o tratamento com cetotifeno de ratos com câncer de mama logo após a indução da neoplasia reduziu os índices de proliferação tumoral e de apoptose (FAUSTINO-ROCHA et al., 2017). Drogas estabilizadoras de

mastócitos, como o próprio cetotifeno, têm sido consideradas para o tratamento de doenças metabólicas como a obesidade e diabetes (WANG et al., 2011).

1.4 Racional científico

Nos últimos anos, a EM tem sido a segunda doença autoimune mais abordada em artigos publicados em inglês no PUBMED (SELMÍ, 2013) e sua prevalência na população mundial é uma das maiores entre as doenças que acometem o SNC (BROWNE et al., 2014). Grande parte de nosso conhecimento sobre a EM deriva de estudos feitos com a EAE. A patogênese de ambas envolve um processo inflamatório de origem autoimune, no qual os mastócitos, células altamente relacionadas com fenômenos inflamatórios e vasculares, e consideradas um elo entre as respostas imunes inata e adaptativa, podem estar envolvidos. Considerando que a inibição da exocitose e a consequente redução de mediadores produzidos pelos mastócitos poderia afetar os fenômenos imunológicos e vasculares envolvidos neste processo, drogas estabilizadoras de mastócitos como o cetotifeno poderiam controlar em parte o processo inflamatório associado à EAE/EM e, portanto, serem explorados como terapia adjunta nestas patologias.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da droga estabilizadora de mastócitos fumarato de cetotifeno no desenvolvimento da encefalomielite autoimune experimental

2.2 Objetivos específicos

a) Determinar o efeito do tratamento com fumarato de cetotifeno sobre o desenvolvimento clínico da EAE (peso e escore clínico).

b) Investigar o efeito do tratamento com fumarato de cetotifeno nos parâmetros imunológicos periféricos associados ao desenvolvimento da EAE (subpopulações celulares e produção de citocinas)

c) Investigar o efeito do tratamento com fumarato de cetotifeno nas alterações causadas pela EAE no sistema nervoso (características histopatológicas, subpopulações celulares e produção de citocinas)

d) Investigar o efeito do tratamento com fumarato de cetotifeno na função da barreira hematoencefálica em animais com EAE

Materials e métodos

3 MATERIAIS & MÉTODOS

3.1 Animais e indução de EAE

Camundongos C57BL/6, fêmeas, com idade de 5 a 6 semanas foram adquiridos do biotério Geral da Prefeitura do *Campus* USP de Ribeirão Preto (PUSP-RP). Os animais foram mantidos e aclimatados no biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB-USP) ou no biotério do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB-UNESP). Em ambos os locais, os animais foram acondicionados em microisoladores situados em sala climatizada (21-23°C), sob regimes fotoperiódicos de 12 horas, com alimentação e água *ad libitum*. Os experimentos foram conduzidos no laboratório de vacinas e imunomodulação do Departamento de Microbiologia e Imunologia (IBB-UNESP) de acordo com as especificações do Comitê de Ética em Experimentação Animal do IBB-UNESP (CEUA) e do Comitê de Ética da FOB-USP (CEEPA) (processo CEUA nº 638 e processo CEEPA nº 19/2014 – anexos A e B, respectivamente).

Para a maioria das avaliações descritas a seguir, os animais foram divididos em 3 grupos:

- 1- Grupo EAE: animais submetidos à indução da doença, sem tratamento;
- 2- Grupo EAE/Ceto: animais submetidos à indução da doença e tratados diariamente com cetotifeno (doses intraperitoneais (ip.) de 0,4 mg/kg, *Sigma Aldrich*, cat. nº K26280) (KIM, M. S. et al., 2013) a partir do 7º dia após a indução da EAE, durante 11 dias (**figura 1**).
- 3- Grupo CTRL: animais saudáveis, ou seja, não submetidos à indução da doença e nem ao tratamento com cetotifeno.

* As comparações realizadas neste estudo estão principalmente relacionadas aos grupos EAE e EAE/Ceto. Quando considerados relevantes os resultados do grupo CTRL foram incluídos e discutidos.

Os animais dos grupos EAE e EAE/Ceto foram imunizados com 150 µg de MOG (*Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein 35-55 – Genemed Synthesis Inc., Texas, EUA*) em 50 µL de Adjuvante Completo de Freund (*Sigma-Aldrich Corp., Missouri, EUA*) contendo *Mycobacterium tuberculosis* (4 mg/mL) via subcutânea no dorso. A emulsão foi feita com auxílio de 2 seringas de vidro e a consistência e a coesão da emulsão foram avaliadas colocando uma pequena amostra sobre água gelada em béquer. No dia da imunização e 48 horas após

foram administrados 250 ng de toxina *pertussis* (PTX, *Sigma-Aldrich Corp., Missouri, EUA*) em 200 μ L de PBS via ip. por animal.

3.2 Avaliação clínica da EAE

Os animais foram diariamente avaliados quanto ao peso corporal e o escore clínico a partir do dia 10 da indução até o dia 18 (**figura 1**). Os diferentes escores clínicos foram determinados pelo grau de paralisia segundo os critérios definidos na **tabela 1**.

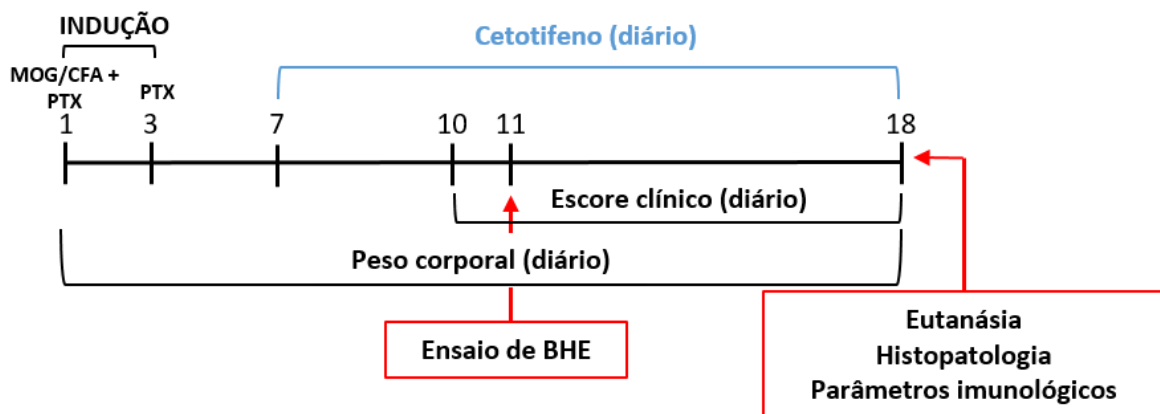


Figura 1. Linha temporal ilustrativa dos procedimentos de indução da EAE, tratamento com cetotifeno, avaliação dos parâmetros clínicos, histopatológicos e imunológicos. Os animais dos grupos EAE e EAE/Ceto foram imunizados e inoculados com a 1ª dose de toxina *pertussis* no dia 1. No dia 3 foi inoculada a 2ª dose de toxina. As avaliações de peso corporal foram realizadas diariamente desde o início do protocolo experimental. Já o escore clínico foi avaliado diariamente a partir do 10º dia após a indução. No dia 18 os animais foram eutanasiados para realização dos diferentes ensaios (MOG – glicoproteína da mielina de oligodendrócitos; CFA – adjuvante completo de Freund; PTX – toxina *pertussis*).

Tabela 1. Determinação do escore clínico da EAE com base em alterações motoras.

Escore clínico	Alterações motoras
0	Normal
1	Cauda frouxa
2	Paraparesia moderada, perda da tonicidade do movimento do quadril
3	Paralisia parcial dos membros posteriores
4	Paraplegia
5	Tetraplegia ou paraplegia com fraqueza pronunciada dos membros anteriores/ morte

3.3 Coleta do soro, SNC e órgãos linfóides secundários

Dezoito dias após a imunização, os animais foram anestesiados com quetamina e xilazina e realizada a punção cardíaca para coleta do sangue, separação do soro e quantificação de citocinas séricas por *Cytometric Beads Array*-CBA. Baço e linfonodos inguinais e braquiais foram retirados e armazenados em microtubos contendo meio RPMI refrigerado. Em seguida, os camundongos foram dispostos em decúbito ventral e realizadas incisões caudal-craniais para retirada dos segmentos lombar e torácico da medula, bem como do cérebro para avaliações posteriores.

3.4 Análise histopatológica

O segmento lombar da medula dos animais dos 3 grupos experimentais foi fixado em formalina tamponada 10% e submetido à rotina histotécnica de inclusão em “paraplast plus” (*McCormick Comp., Maryland, EUA*) e emblocamento. As amostras foram então cortadas em micrótomo (RM2245, *Leica Biosystems, Wetzlar, Germany*) e os cortes (5µm de espessura) foram dispostos sobre lâminas de vidro, as quais foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E) (**tabela 2**). A análise da presença de infiltrado inflamatório (IF) foi realizada em microscópio óptico (*Axiolab, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha*) com objetiva de 10x e as imagens foram adquiridas por meio de câmera digital acoplada ao microscópio. Uma análise semi-quantitativa, adaptada de Soellner e colaboradores (2013), foi realizada com base na classificação do infiltrado inflamatório de acordo com a presença de células inflamatórias, localização e intensidade (**tabela 3**).

Tabela 2. Procedimento empregado para coloração de lâminas histológicas por H&E.

<i>Etapa</i>	<i>Procedimento</i>
Desparafinização	Dois banhos em xilol (20 minutos, cada).
Reidratação	Álcool absoluto, 95° e 70°, e lavagem em água.
Coloração	Hematoxilina (15 minutos), lavagem em água corrente (10 minutos) e passagem em diferenciador. Eosina (7 minutos) e lavagem em água.
Desidratação	Álcoois crescentes (70°, 95° e absoluto) e em álcool absoluto + xilol (50%).
Diafanização	Banhos em xilol I, II e III.

Tabela 3. Classificação do infiltrado inflamatório (IF) nos cortes histológicos de medula

<i>Escore</i>	<i>Descrição</i>
0	Ausência de IF (semelhança com controle negativo)
+	Leve IF na periferia do órgão
++	Focos de IF na periferia do órgão
+++	IF moderado a intenso na periferia e infiltração no parênquima do órgão

3.5 Obtenção de células de baço, linfonodos e SNC

Baço e linfonodos inguinais e braquiais foram macerados com auxílio de êmbolo de seringa sobre peneiras de nylon (*cell strainers*) com poros de 70 µm. A suspensão celular obtida foi centrifugada a 400xg por 5 minutos a 4°C e o botão celular ressuspense em meio RPMI para mais uma centrifugação. Ao final, as células foram ressuspensas em meio RPMI Completo (1% de piruvato de sódio, 1% de aminoácidos não-essenciais, 10% de soro bovino fetal (SBF), 2% de L-glutamina e 1% de gentamicina). Nas amostras oriundas do baço as hemácias foram lisadas por incubação em tampão contendo cloreto de amônio (NH₄Cl).

Cérebro e medula cervical/torácica obtidos como descrito anteriormente foram processados para obtenção de células mononucleares. Para isto, os órgãos foram cortados em pequenos pedaços e incubados em placa de Petri contendo 3 ml de meio de cultura e 1 ml de colagenase D (*Roche, Mannheim, Germany*) (2,5mg/ml de meio de cultura) por 45 minutos em estufa de CO₂ a 37°C. Em seguida, as amostras foram maceradas em *cell strainers* e centrifugadas a 450xg por 15 minutos a 4°C. O botão celular foi ressuspense em Percoll a 30% e a suspensão obtida foi acomodada sobre 4 ml de Percoll a 70% para centrifugação (950xg por 20 minutos a 4°C). O halo de células mononucleares foi coletado e transferido para tubos de 15ml contendo meio de cultura gelado. Após centrifugação (450xg por 10 minutos a 4°C) o botão celular foi ressuspense em 1 ml de meio de cultura.

Para as avaliações de produção de citocinas e citometria de fluxo, as amostras das células foram diluídas em solução de Türk e contadas considerando a morfologia de linfócitos (célula pequena com núcleo arredondado e citoplasma escasso).

3.6 Produção de citocinas por células de baço e linfonodos

As células foram distribuídas em placas de 48 poços na densidade de 5 x 10⁶/mL e reestimuladas com MOG na concentração de 20 µg/mL. Quarenta e oito horas após, o sobrenadante foi coletado e armazenado para dosagens de citocinas por ELISA. A quantificação

de citocinas por ELISA foi realizada segundo instruções dos fabricantes dos kits de dosagem BD Biosciences (*California, USA*) para IFN- γ , IL-2 e IL-10; e R&D Systems (*Minnesota, USA*) para TNF- α , IL-6 e IL-17. Os resultados foram obtidos através de leitor de absorbância (Bio-Tek Instruments, *Vermont, USA*) a 490 nm.

3.7 Quantificação de subpopulações de linfócitos T, células dendríticas, micróglia e mastócitos por citometria de fluxo

As células foram coletadas como descrito anteriormente e as hemácias foram lisadas com tampão contendo NH₄Cl. As amostras de cada animal (1×10^6 células) foram incubadas com os anticorpos de marcação extracelular correspondentes ao painel de cada tipo celular (**tabela 4**) por 30 minutos, no escuro e a 4°C. Nas amostras para identificação de linfócitos Tregs, após retirada do excesso dos anticorpos por centrifugação, o botão celular foi ressuspenso em tampão de permeabilização (30 minutos a 4°C), lavado e incubado com o anticorpo de marcação intracelular anti-Foxp3-PE (0,2 μ g) por 30 minutos a 4°C. Por fim, as células foram fixadas com paraformaldeído 1%. Em citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton Dickinson, *California, USA*) foram adquiridos 100.000 eventos para a quantificação de linfócitos, micróglia e mastócitos, e 300.000 eventos para células dendríticas. A análise dos resultados foi realizada através do software FlowJo (TreeStar, *Oregon, USA*). Os layouts de análise das subpopulações celulares são mostrados nas **figuras 4, 7, 14, 16 e 20**.

Tabela 4. Painel de anticorpos utilizados para identificação de linfócitos T auxiliares, citotóxicos, Tregs, células dendríticas (DCs) e mastócitos.

<i>Tipo celular</i>	<i>Anticorpos utilizados</i>	<i>Clones</i>	<i>Quantidade</i>
<i>Linfócitos T auxiliares e citotóxicos</i>	Anti-CD45-PeCy7	30-F11	0,06 µg
	Anti-CD3-PerCPCy5.5	145-2C11	0,2 µg
	Anti-CD8-PE	53-6.7	0,05 µg
	Anti-CD4-FITC	GK1.5	0,6 µg
<i>Linfócitos Tregs</i>	Anti-CD3-PercPCy5.5	145-2C11	0,1 µg
	Anti-CD4-FITC	GK1.5	0,6 µg
	Anti-CD25-APC	PC61.5	0,25 µg
	Anti-Foxp3-PE (Intracelular)	FJK-16s	0,2 µg
<i>DCs</i>	Anti-F4/80-PerCPCy5.5	BM8	0,1 µg
	Anti-CD11c-FITC	N418	0,25 µg
	Anti-MHCII-APC	MS/114.15.2	0,03 µg
	Anti-CD86-PE	GL1	0,125 µg
	Anti-PD-L1-PECy7	MIH5	0,1 µg
<i>Micróglia</i>	Anti-CD45-PECy7	30-F11	0,06 µg
	Anti-CD11b-PerCP	M1/70	0,2 µg
	Anti-MHCII-APC	MS/114.15.2	0,03 µg
<i>Mastócitos</i>	Anti-CD45-APC	30-F11	0,06 µg
	Anti-CD117-FITC	2B8	0,25 µg
	Anti-FcεRI-PECy7	MAR-1	0,06 µg

*Todos os anticorpos foram adquiridos da eBiosciences

3.8 Níveis de expressão de transcritos relacionados às subpopulações de linfócitos T auxiliares, mastócitos e IDO em linfonodos e/ou medula espinhal por RT-PCR

Células obtidas de linfonodos inguinais ou medulas lombares de animais dos grupos CTRL, EAE e EAE/Ceto foram armazenadas em criotubos a - 80°C para análise da expressão de diferentes transcritos (**Tabela 5**) pelo método de RT-PCR em tempo real.

Para a extração de RNA, linfonodos (células) ou medula espinhal foram macerados em 300 µL de reagente Trizol (Life Technologies, *California, USA*). Após completar o volume de Trizol para 1 mL e adicionar 250 µL de clorofórmio, a amostra foi vigorosamente agitada em vórtex por 10 segundos e, em seguida, deixada no gelo por 10 minutos. Após este período, a amostra foi centrifugada a 12.000g por 15 minutos (4°C), a fase aquosa transferida para um novo tubo e 500 µL de isopropanol gelado foram adicionados. As amostras foram agitadas no vórtex por 10 segundos, incubadas a -20°C por 20 minutos e centrifugadas novamente para remoção dos sobrenadantes, cuidadosamente. Os *pellets* foram lavados 2 vezes com etanol 95% por centrifugação a 12.000g por 5 minutos (4°C) e, em seguida, os criotubos foram deixados em temperatura ambiente para secagem dos *pellets*. Em seguida, as amostras foram ressuspensas em água livre de nucleases (20-35 µL) e a quantificação de RNA foi realizada utilizando o equipamento NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, *Boston, USA*). A pureza do RNA extraído foi baseada na razão das absorvâncias medidas nos comprimentos de onda 260 e 280 nm; os valores próximos de 2.0 foram considerados aceitáveis. A síntese de cDNA fita simples foi realizada a partir de 200 ng de RNA extraído, utilizando-se o *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, *California, USA*). Para cada 10 µL de RNA total foram adicionados 2 µl de 10x RT-Buffer, 0,8 µl de 25x dNTP a 100 mM, 2 µl de 10x *RT-Random Primers*, 1 µl de *Multiscribe Reverse Transcriptase*, 1 µl de inibidor de RNase e 3,2 µl de água livre de nucleases. A reação foi incubada em termociclador por 10 minutos a 25°C, e em seguida, submetida a 37°C por 120 minutos, 85°C por 5 minutos e finalizada a 4°C. Alíquotas de 5 µL de cDNA (diluído 20 vezes) foram submetidas à reação de PCR em tempo real utilizando-se 6,25 µL de *TaqMan Gene Expression Master Mix* (Life Technologies, *California, USA*), 0,625 µL de água livre de nucleases e 0,625 µL de cada primer, nas seguintes condições: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos mais 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Nas reações de PCR em tempo real para detecção dos transcritos específicos de mastócitos (WERNERSSON; PEJLER, 2014) (Cma1, CPA3 e mMCP4) foi utilizado o dobro destes componentes.

Tabela 5. Primers utilizados na quantificação de transcritos em amostras de linfonodos inguinais (LN) ou de medula espinhal (Md) por RT-PCR.

<i>Primers</i>	<i>Descrição do alvo</i>	<i>Amostra</i>
NM_008084.2 (GAPDH)	Níveis foram utilizados para as análises comparativas	LN/ Md
Mm00450960_m1 (Tbx21/ T-bet)	Fator de transcrição que regula a diferenciação de linfócitos Th1 e controla a expressão de IFN- γ	LN/ Md
Mm00484683_m1 (GATA-3)	Fator de transcrição que regula a diferenciação de linfócitos Th2 e a produção de IL-4, IL-5 e IL-13	LN/ Md
Mm01261022_m1 (RORc/ROR- γ t)	Receptor nuclear requerido na diferenciação de linfócitos Th17	LN/ Md
Mm00475162_m1 (Foxp3)	Fator de transcrição que controla o desenvolvimento de linfócitos Treg	LN/ Md
Mm00492590_m1 (IDO)	Enzima que participa do catabolismo do triptofano relacionada com a indução de tolerância imunológica	LN
Mm00487638_m1 (Cma1)	Quimase (CMA1 ou mMCP-5) estocada nos grânulos de mastócitos murinos com ação elastase- <i>like</i>	Md
Mm00483940_m1 (CPA3)	Carboxipeptidase do tipo A3 (<i>Cpa-3</i>) estocada nos grânulos de mastócitos murinos relacionada com a inativação de peptídeos tóxicos	Md
Mm00487636_g1 (mMCP4)	Quimase (mMCP-4) estocada nos grânulos de mastócitos murinos relacionada com a degradação da matriz extracelular e peptídeos; geração de peptídeos vasoativos	Md

3.9 Ensaio de barreira hematoencefálica

A avaliação da permeabilidade da BHE foi realizada com base no protocolo descrito por Christy e colaboradores (2013). No 11º dia após a indução da EAE, animais dos grupos CTRL, EAE e EAE/Ceto foram inoculados via ip. com 100 µL de fluoresceína sódica 10% (NaFlu – *Sigma Aldrich*). Após 20 minutos, os animais foram anestesiados e o sangue retirado por punção cardíaca com seringa heparinizada. Em seguida, os animais foram perfundidos com 10 mL de solução salina 0,9% e o cérebro e medula espinhal dissecados e pesados em microtubos com pesos conhecidos. Nos microtubos, os órgãos foram macerados com pistilo na presença de 400µL de salina 0,9% e centrifugados, junto dos microtubos contendo o sangue puncionado, a 8600g, 22° C por 10 minutos. Sobrenadantes e plasma foram recolhidos (100 µL) e colocados em duplicatas em placa preta de 96 poços. Poços contendo somente salina 0,9% foram utilizados como branco. A leitura das amostras foi realizada em fluorímetro *Synergy 4, Biotek Instruments* com emissão/excitação de 485/528 e sensibilidade em 35. Os resultados obtidos na leitura foram expressos em unidades relativas de fluorescência (RFU).

Para avaliar a incorporação de Naflu na medula espinhal ou no cérebro de cada animal foi realizado o seguinte cálculo:

$$\text{Incorporação de Naflu} = \frac{(\text{Média RFU da amostra} / \text{Peso do órgão})}{(\text{Média RFU do plasma} / \text{Volume do sangue extraído})}$$

3.10 Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e teste de Levene. Dados que geraram valor de $p > 0,05$ no teste de normalidade foram considerados paramétricos e foram expressos como média \pm desvio padrão (SD) dos valores ou porcentagens obtidas para cada grupo. Já os dados não-paramétricos ($p < 0,05$ no teste de normalidade) foram representados e analisados pelas medianas, 1º e 3º quartis. Incidências da EAE e de infiltrado inflamatório no SNC foram comparadas através de qui-quadrado ou teste de Fischer. Nas comparações de escore clínico empregou-se o teste de Mann-Whitney por tratar-se da comparação de variáveis qualitativas ordinais de dois grupos não-pareados. Nas avaliações por pares de variáveis quantitativas não-pareadas foram empregados os testes T e Mann-Whitney para dados paramétricos e não-paramétricos, respectivamente. Quando estas avaliações envolveram mais de 2 grupos, empregou-se o teste ANOVA *one-way*, uma vez que os dados apresentaram distribuição normal. Para a comparação de dados não-paramétricos de 3 grupos não-pareados foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis.

Em todas as análises estatísticas o nível de confiança aplicado foi de 95% ($p < 0,05$). Foram utilizados os seguintes *softwares* para as análises estatísticas e composição dos gráficos: GraphPad Prism 5.0 (*GraphPad, San Diego, California*), SigmaPlot 12.0 (*Systat, San Jose, California*) e Statistica 10 (*StatSoft, Tulsa, Oklahoma*).

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Desenvolvimento clínico da EAE

O tratamento com cetotifeno no período subclínico da EAE modificou o curso desta doença. Esta modificação foi constatada a partir de comparações estatísticas entre dados referentes à incidência, escore clínico e peso corpóreo dos animais. Um dos parâmetros alterados foi a incidência da doença. Ao final da fase aguda da encefalomielite, cerca de 84 % dos animais do grupo EAE apresentaram sintomatologia característica da doença. Em grande parte destes indivíduos (74 %), o aparecimento dos sinais clínicos ocorreu entre os dias 11 e 14. Comparando-se os dados de incidência entre os grupos EAE e EAE/Ceto através do teste de qui-quadrado ou teste de Fischer ($p < 0,05$), notou-se uma redução significativa da incidência da doença no grupo tratado já a partir do 12º dia após a indução. Ao final da fase aguda da doença, somente 27 % dos animais do grupo EAE/Ceto apresentaram alterações motoras. Metade destes poucos animais doentes só manifestaram os sinais clínicos tardiamente, isto é, por volta de 16 a 18 dias (**tabela 6**).

As alterações no desenvolvimento da EAE associadas ao tratamento também foram evidenciadas nas comparações entre os dados de escore clínico. Constatou-se uma redução significativa da gravidade da doença quando foram comparados os escores médios diários (**figura 2A**) e os escores máximos registrados durante a fase aguda da doença (**figura 2B**). O tratamento com cetotifeno também preveniu a perda de peso causada pela doença. Os animais do grupo EAE/Ceto tiveram uma variação de peso semelhante à observada nos animais saudáveis (grupo CTRL) e significativamente menor que a observada nos animais do grupo EAE (**figura 2C**).

Nas comparações envolvendo somente animais doentes de ambos os grupos, as diferenças nos escores diários e escores máximos também evidenciaram o efeito protetor determinado pelo tratamento com cetotifeno (**figura 3**). Ao final das avaliações (dia 18), 50% dos animais doentes do grupo EAE apresentavam escores 4 ou 5 (paraplegia acompanhada ou não de fraqueza dos membros anteriores) e 37,5 % apresentavam escores 2 ou 3 (paraparesia moderada ou paralisia parcial dos membros posteriores). Dos animais tratados com cetotifeno que desenvolveram a doença, 50% apresentavam apenas o aspecto de cauda frouxa (escore 1) e 33,3 % atingiram os escores 2 ou 3. Ainda neste grupo, somente 1 animal apresentou paraplegia, chegando ao escore 4, o que ocorreu durante o protocolo experimental em que todos os animais do grupo EAE atingiram o escore 5.

Tabela 6. Efeito do cetotifeno na incidência diária da EAE durante a fase aguda da doença. Percentuais obtidos a partir do número de animais doentes dentre o total de animais imunizados para cada grupo (n). Comparação efetuada por meio do teste estatístico qui-quadrado ou teste de Fischer (nível de confiança: 95%). Número total de animais resultou de 4 experimentos independentes realizados.

<i>Grupo</i>	<i>Dia após a indução</i>	Incidência diária (%)							
		11	12	13	14	15	16	17	18
<i>EAE (n= 19)</i>		16 %	47 %	58 %	74 %	74 %	74 %	79 %	84 %
<i>EAE/Ceto (n= 22)</i>		0 %	4,5 % ^a	9 % ^b	14 % ^c	14 % ^c	18 % ^d	18 % ^c	27 % ^c

*Comparação pelo teste de Fischer. ^a $p=0,002$; ^b $p=0,003$; ^c $p<0,001$; ^d $p=0,001$.

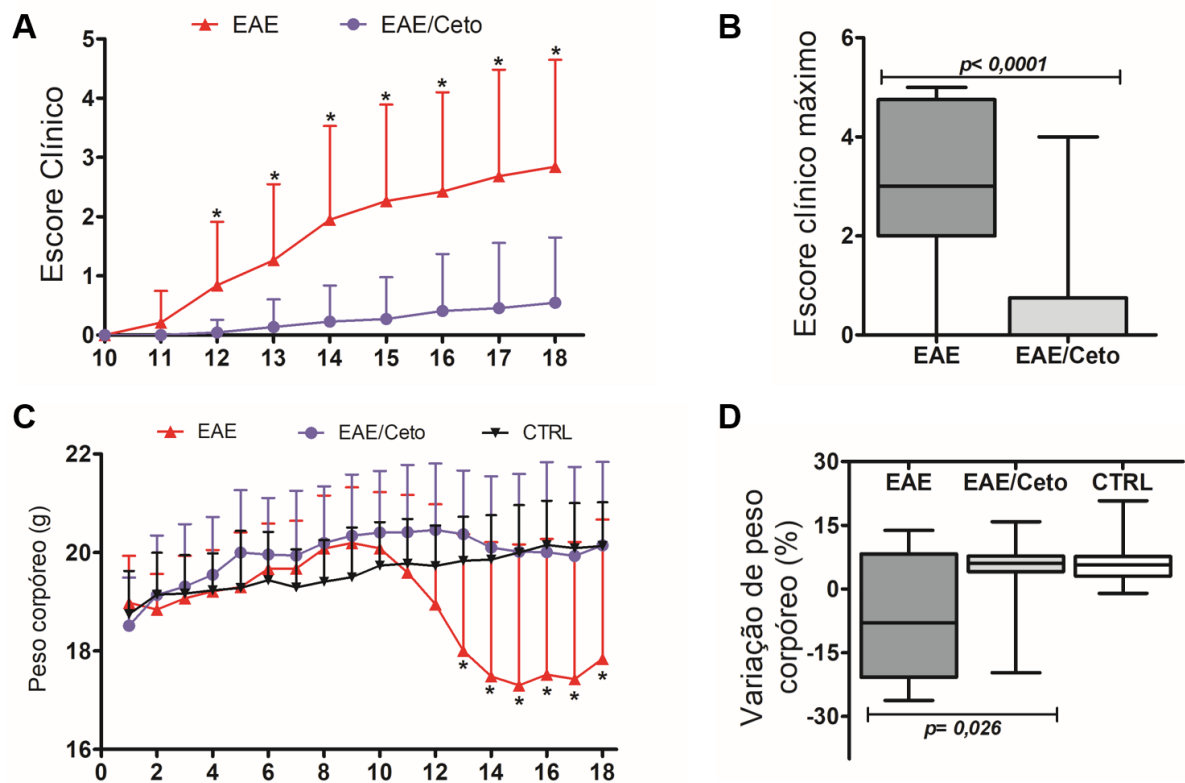


Figura 2. Efeito do cetotifeno em parâmetros clínicos da EAE. Camundongos C57BL/6 fêmeas foram submetidos à indução de EAE e tratados com cetotifeno a partir do 7º dia. O escore clínico e o peso corpóreo dos animais foram avaliados diariamente. Os dados de escores clínicos diários dos animais dos grupos EAE (n=19) e EAE/Ceto (n=22) (A) e os escores clínicos máximos atingidos (B) foram comparados pelo teste de Mann-Whitney (* $p < 0,01$). Comparação do peso corpóreo diário (C- $p < 0,01$, teste ANOVA *one-way*) e da variação de peso corpóreo (teste de Kruskal-Wallis) também foram realizadas (D), incluindo os dados do grupo CTRL (n=19). Dados obtidos de 4 experimentos independentes.

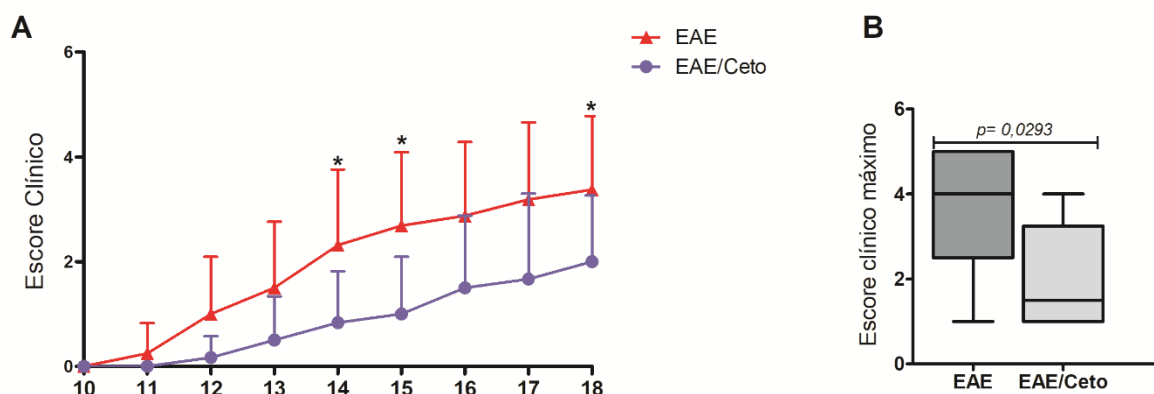


Figura 3. Efeito do cetotifeno sobre a gravidade da EAE. Comparação dos escores clínicos diários (A) e do escore clínico máximo (B) dos animais doentes dos grupos EAE (n=16) e EAE/Ceto (n=6). Dados obtidos de 4 experimentos independentes (teste de Mann-Whitney, * $p < 0,05$).

4.2 Resposta imune periférica

Está bem estabelecido que o desenvolvimento da EAE é precedido por alterações acentuadas na resposta imune periférica, em especial envolvendo linfócitos T, células dendríticas e produção de citocinas. Neste sentido, investigamos se a ausência de sintomas clínicos na maioria dos animais tratados com cetotifeno estava associada com inibição de algumas destas alterações.

a. Subpopulações de linfócitos

O layout da análise das subpopulações de linfócitos por citometria de fluxo está explicitado na **figura 4**.

Avaliações do número de células com morfologia linfocitária nas fases pré-clínica e aguda da EAE indicaram que após 18 dias da indução da EAE o número de células com morfologia linfocitária nos linfonodos de animais do grupo EAE/Ceto é significativamente maior que o observado nos órgãos correspondentes do grupo não tratado (grupo EAE). Na fase pré-clínica da doença não foram detectadas diferenças entre os grupos (**figura 5A**). Durante a dissecação foi constatado que, após 18 dias, estes órgãos linfoides estavam macroscopicamente aumentados nos animais do grupo EAE/Ceto (dados não mostrados).

A composição linfocitária dos linfonodos foi avaliada através de citometria de fluxo. Esta análise indicou que o grupo EAE/Ceto possui menor percentual de linfócitos T ($CD3^+$) (**figura 5B**) e percentuais semelhantes de linfócitos T auxiliares ($CD3^+CD4^+$) e Tregs ($CD3^+CD4^+CD25^{hi}Foxp3^+$) (**figuras 5C e 5D, respectivamente**). Para fazermos uma avaliação aproximada do número total de linfócitos T, T auxiliares e Tregs presentes nos linfonodos, calculamos um número estimado multiplicando-se os percentuais médios de cada tipo celular e os valores médios obtidos pela contagem de células com morfologia linfocitária dos linfonodos dos grupos EAE e EAE/Ceto. A comparação dos dados obtidos demonstrou que os números estimados para o grupo EAE/Ceto foram significativamente maiores que os números estimados para o grupo EAE, independentemente do tipo celular (**figuras 5E, 5F e 5G**).

A avaliação das diferentes subpopulações de linfócitos T obtidos destes linfonodos, baseada na análise da expressão de T-bet, GATA-3, ROR- γ t e Foxp3 indicou participação similar dos mesmos nos dois grupos experimentais (**figuras 6A e 6B**). O cálculo da razão entre T-bet e GATA-3 (Th1/Th2) e entre Foxp3 e ROR- γ t (Treg/Th17) também indicou similaridades entre os grupos EAE e EAE/Ceto (**figuras 6C e 6D**).

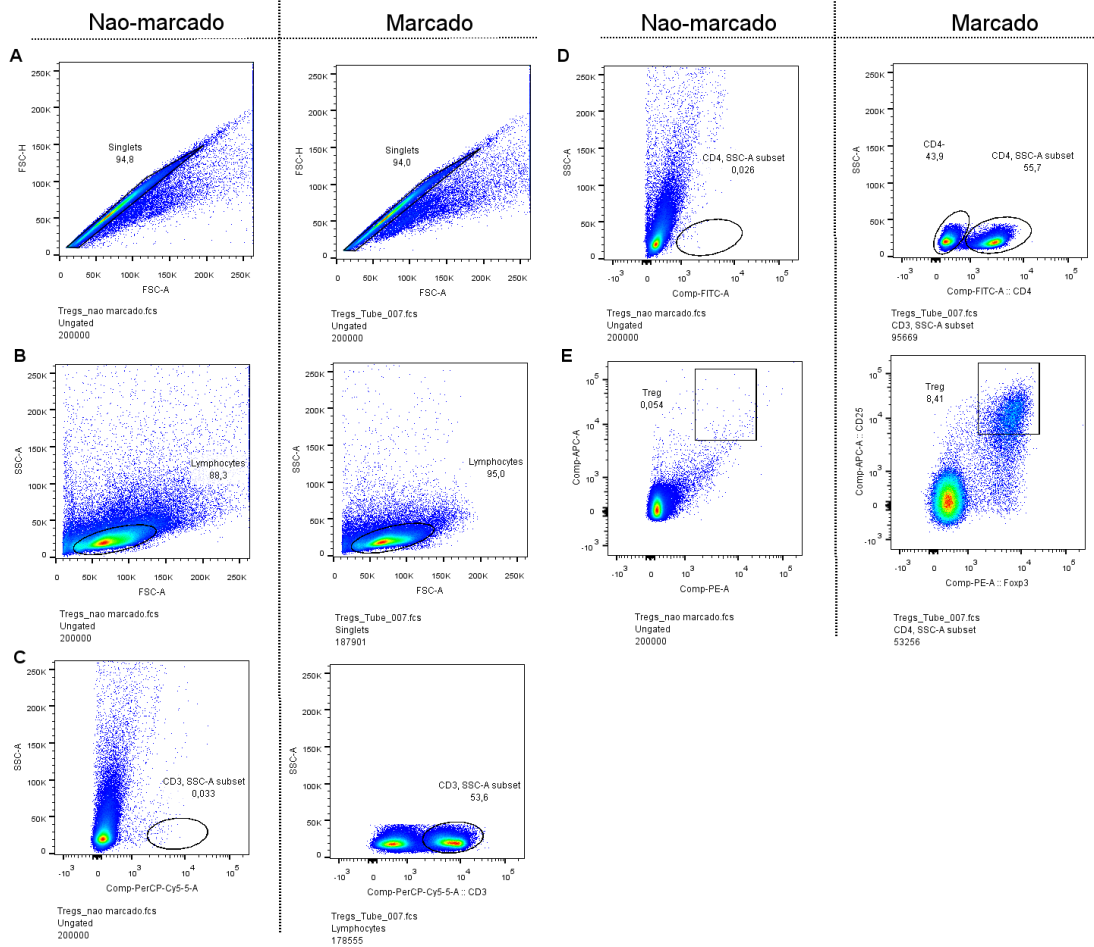


Figura 4. Layout da análise de linfócitos T totais ($CD3^+$), T auxiliares ($CD4^+$), T reguladores ($CD25^{\text{high}}$ $Foxp3^+$) em linfonodos inguinais e braquiais dos grupos EAE e EAE/Ceto. A figura mostra a comparação das *gates* na análise de células sem marcações com anticorpos (não-marcado) e de células marcadas com anti-CD3-PerCP, anti-CD4-FITC, anti-CD25-APC e anti-Foxp3-PE (quadros à esquerda e à direita de cada subitem, respectivamente). Em (A) células individualizadas (*singlets*) estão delimitadas. Em (B) está a circunscrição da população com tamanho e granulosidade de linfócitos (*gate Lymphocytes*). Em (C), (D) e (E), respectivamente, verifica-se a delimitação (*gates*) das células positivas para os marcadores CD3, CD4 e $CD25^{\text{high}}$ $Foxp3$. Eventos (100.000) adquiridos em citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton Dickinson, California, USA) e análises realizadas no software FlowJo (TreeStar, Oregon, USA).

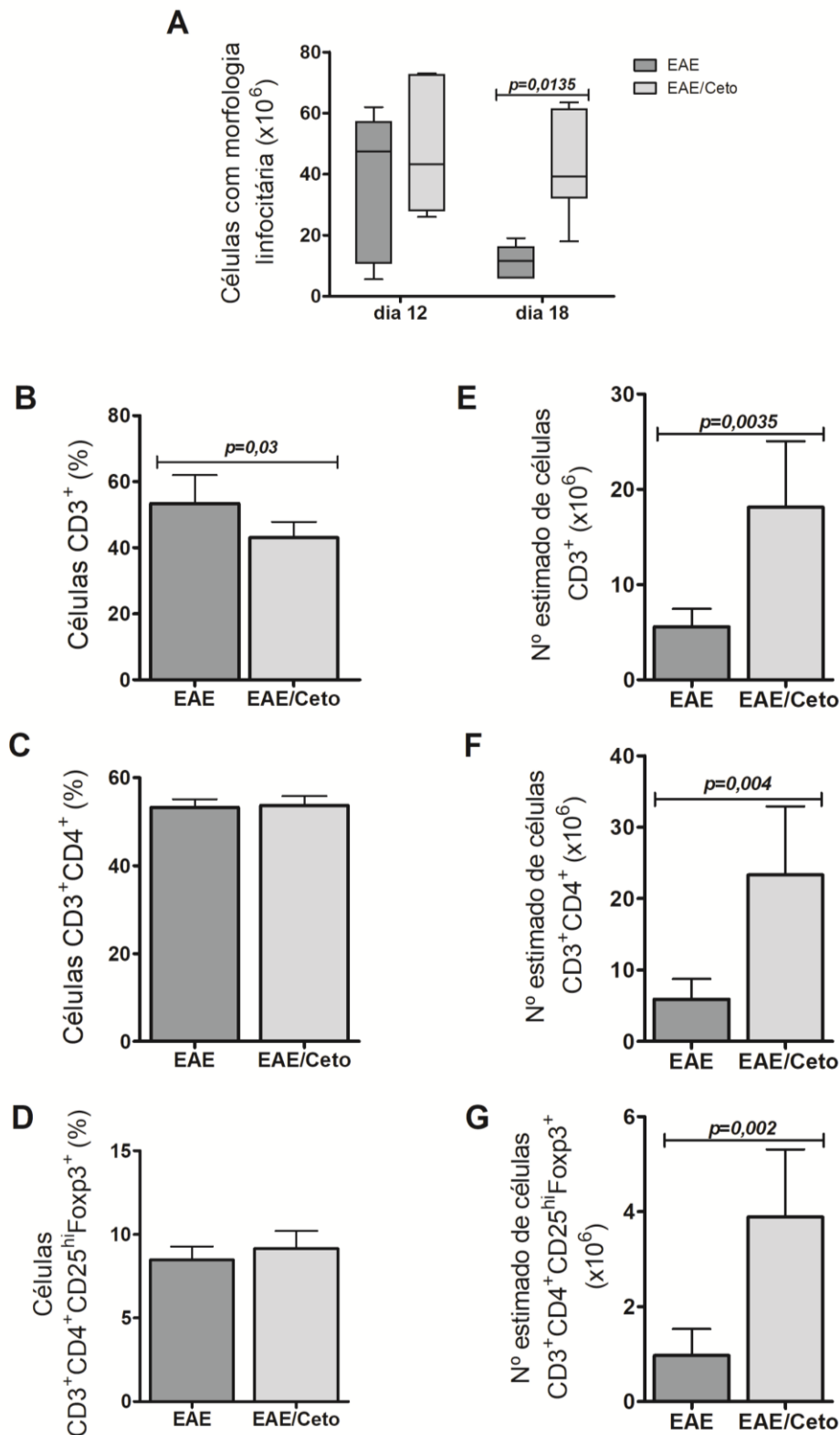


Figura 5. Efeito do cetotifeno em parâmetros celulares dos linfonodos. O número total de células com morfologia linfocitária típica obtidas dos linfonodos dos animais dos grupos EAE (n=5) e EAE/Ceto (n=6) foi comparado através do teste de Mann-Whitney em cada dia avaliado (A). Os percentuais de células CD3⁺ (B), CD3⁺CD4⁺ (C) e CD3⁺CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺ (D) foram avaliados após 18 dias de indução da EAE e comparados por meio do teste T. Um número estimado de células positivas para cada marcador foi calculado a partir do seu percentual de células positivas sobre o número de células com morfologia linfocitária para cada grupo e comparado por meio do teste T (E-G). Os eventos (100.000) foram adquiridos em citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton Dickinson, California, USA) e analisados no software FlowJo (TreeStar, Oregon, USA).

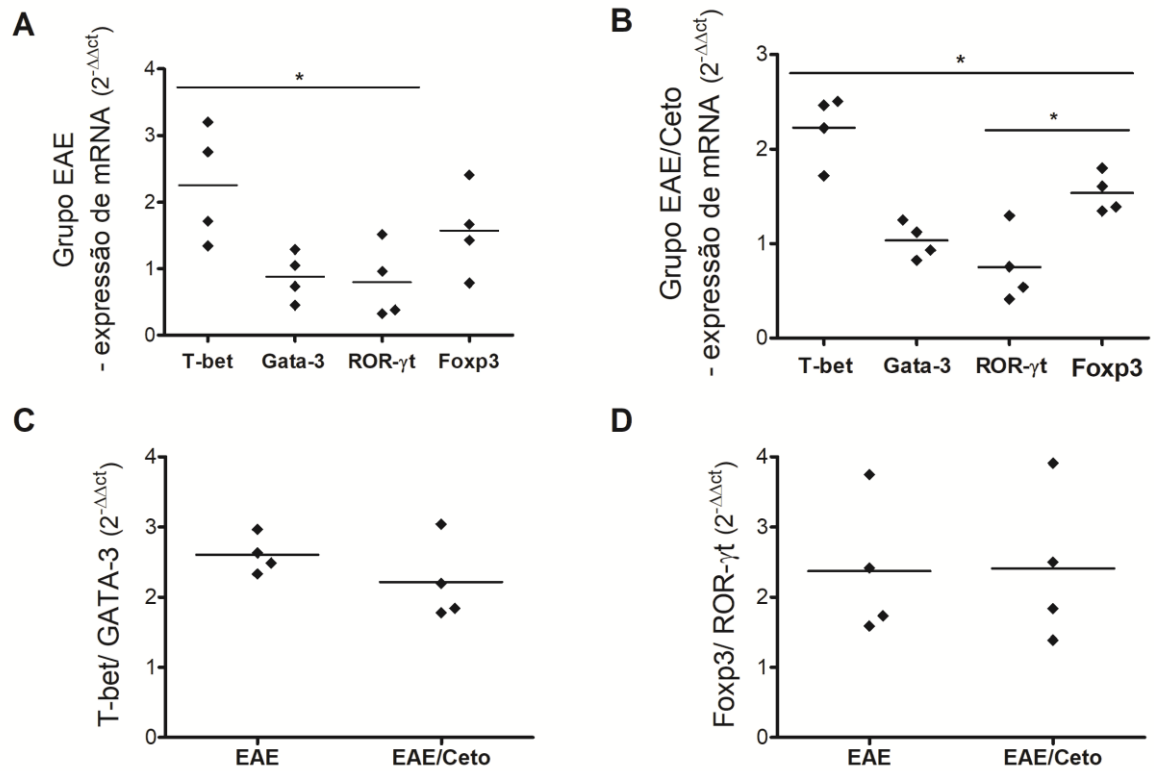


Figura 6. Efeito do cetotifeno na expressão de genes (mRNA) associados às subpopulações de linfócitos T. Expressão dos transcritos (mRNA) T-bet, GATA-3, ROR- γ t e Foxp3 foram analisados por RT-PCR em amostras de linfonodos inguinais de animais dos grupos EAE (A) e EAE/Ceto (B). Comparações dos cálculos da razão entre T-bet e GATA-3 (C) e entre Foxp3 e ROR- γ t (D) também foram realizadas. Análises feitas a partir de amostras de 4 animais de cada grupo avaliado. Os níveis de expressão de mRNA foram representados pelos valores de $2^{-\Delta\Delta ct}$. Como calibradores da reação foram utilizados os valores obtidos da análise de células de linfonodos inguinais de camundongos saudáveis (grupo CTRL). Comparações estatísticas realizadas através de ANOVA *one-way* (A– $p=0,025$ e B– $p<0,001$) e teste T (C e D).

b. Células dendríticas

O layout da análise das DCs por citometria de fluxo está explicitado na **figura 7**.

A relevância das DCs na imunopatogênese da EAE é amplamente evidenciada pela literatura. Através desta metodologia constatamos, inicialmente, que o percentual de células DCs (F4/80⁻CD11c⁺) nos linfonodos inguinais e braquiais de animais do grupo EAE/Ceto foi significativamente maior que o observado nas amostras correspondentes do grupo EAE e do grupo CTRL (**figura 8A**). Avaliamos, então, os percentuais destas células que expressavam os marcadores MHCII, CD86 e PD-L1. O percentual de células F4/80⁻ CD11c⁺ expressando MHCII foi maior nas amostras provenientes de animais do grupo EAE/Ceto (**figura 8B**). Diferentemente, o percentual de células F4/80⁻ CD11c⁺ expressando PD-L1 nestas amostras foi menor que o observado no grupo EAE (**figura 8D**). A intensidade de expressão das moléculas MHCII, CD86 e PD-L1 na superfície das células dendríticas também foi avaliada e os resultados observados estão ilustrados nas **figuras 8E, 8F e 8G**, respectivamente. A alteração mais evidente constatada foi a expressão significativamente menor de PD-L1 nos animais do grupo EAE/Ceto (**figura 8G**).

Através de RT-PCR constatamos que os linfonodos dos animais dos grupos EAE e EAE/Ceto expressam níveis similares IDO (mRNA) (**figura 9**).

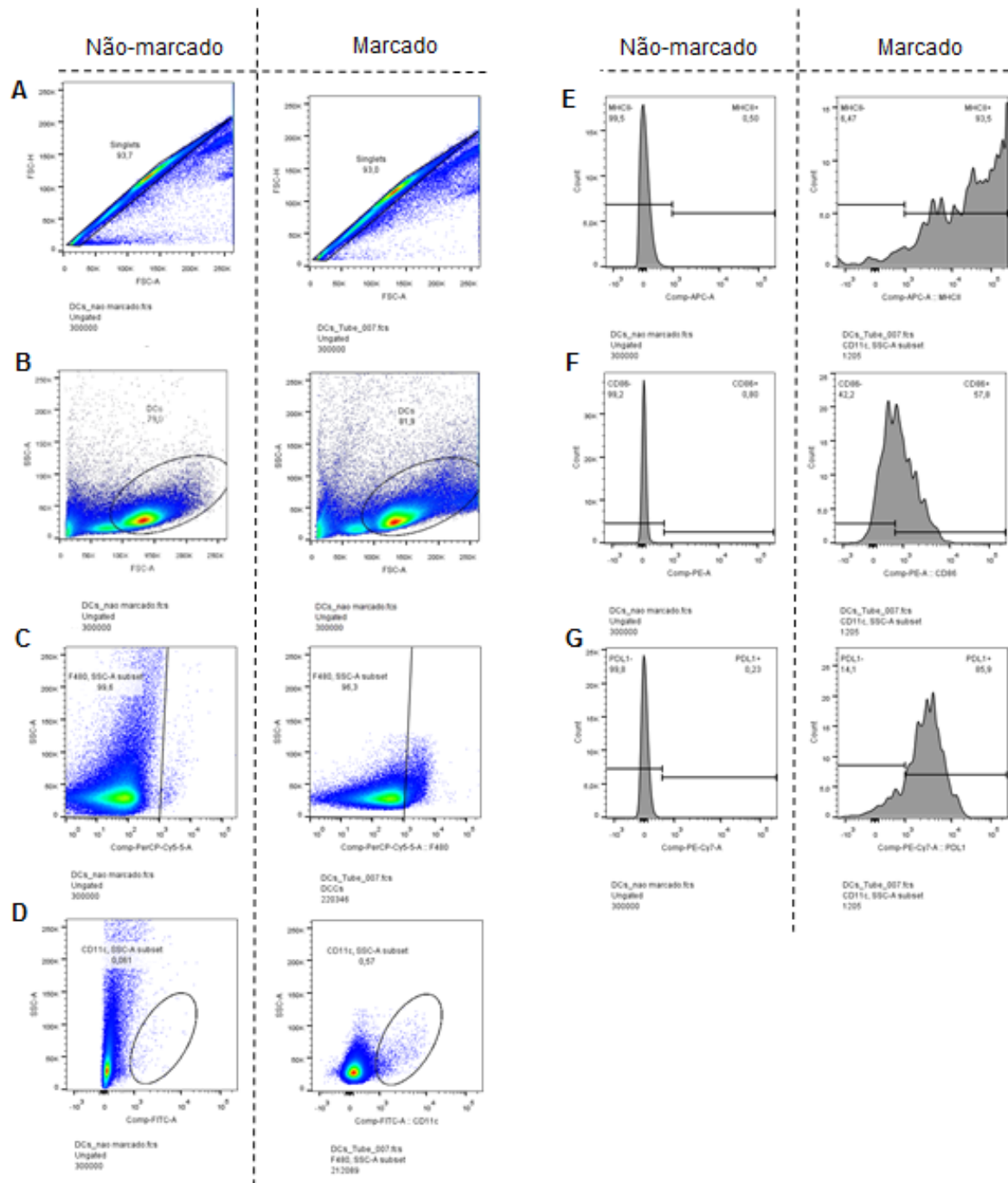


Figura 7. Layout da análise de células dendríticas ($F4/80^- CD11c^+$) em linfonodos inguinais e braquiais dos grupos EAE e EAE/Ceto. Comparação das *gates* na análise de células sem marcações com anticorpos (não-marcado) e de células marcadas com anti-F4/80-PerCPCy5.5, anti-CD11c-FITC, anti-MHCII-APC, anti-CD86-PE e anti-PDL-1-PECy7 (quadros à esquerda e à direita de cada subitem, respectivamente). Em (A) está a delimitação de células individualizadas (*singlets*). Em (B) está a circunscrição da população com tamanho e granulosidade correspondentes às células dendríticas (*gate DCs*). Em (C), células que não expressam a molécula F4/80 foram selecionadas pela *gate*, a fim de excluir macrófagos da análise. Em (D), observa-se a seleção de células $CD11c^+$ dentro da *gate* de células F4/80⁻, as quais foram consideradas como células dendríticas (DCs). Em (E), (F) e (G), respectivamente, estão demonstrados os parâmetros utilizados para as análises de porcentagem de DCs que expressavam as moléculas MHCII, CD86 ou PD-L1. Destes parâmetros também derivaram os dados acerca da intensidade de expressão dessas moléculas (MFI) na superfície celular. Eventos (300.000) adquiridos em citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton Dickinson, California, USA) e análises realizadas no software FlowJo (TreeStar, Oregon, USA).

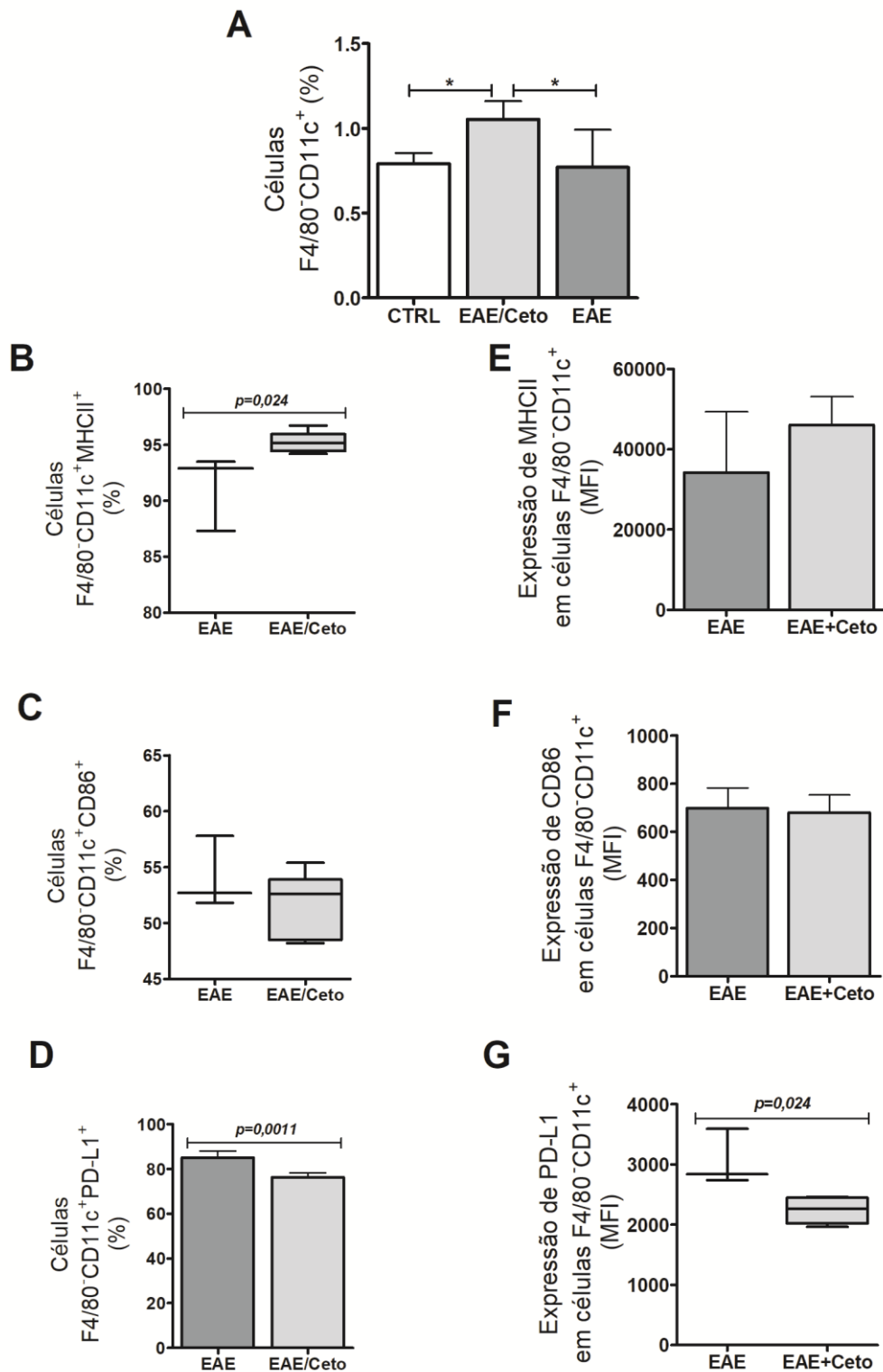


Figura 8. Expressão de marcadores de superfície em células dendríticas (DCs) oriundas de linfonodos dos grupos EAE e EAE/Ceto. Os percentuais de DCs (F4/80⁻CD11c⁺) presentes nos linfonodos dos animais do grupo EAE (n=3), EAE/Ceto (n=6) e CTRL (n=6) foram comparados por meio do teste ANOVA *one-way* (**p*=0,0044) (A). Comparação dos percentuais de DCs expressando MHCII (B), CD86 (C) e PD-L1 (D), bem como a intensidade da expressão destes marcadores (E-G). Teste de Mann-Whitney foi aplicado em (B, C e G) e teste T em (D-F). Os eventos (300.000) foram adquiridos em citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton Dickinson, California, USA) e análises realizadas no software FlowJo (TreeStar, Oregon, USA).

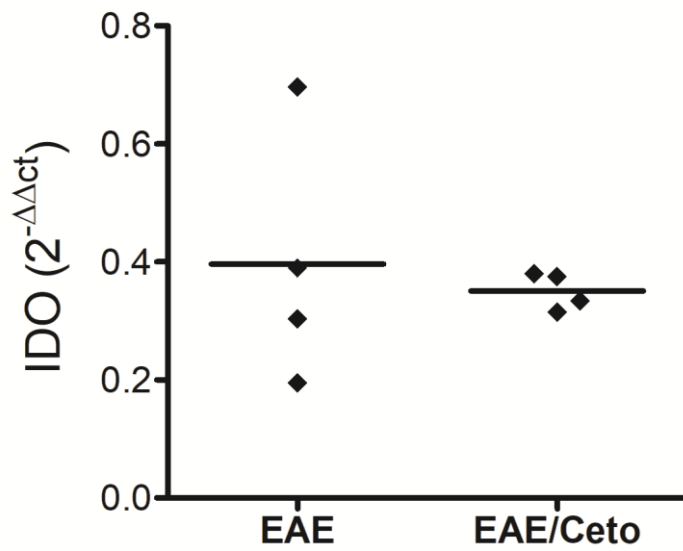


Figura 9. Efeito do cetotifeno na expressão de IDO em linfonodos. Comparação da expressão de IDO obtida por RT-PCR em linfonodos inguinais e braquiais de animais dos grupos EAE e EAE/Ceto. Análise estatística realizada por meio de teste T (4 animais por grupo). Os níveis de expressão de mRNA foram representados pelos valores de $2^{-\Delta\Delta ct}$. Como calibradores da reação foram utilizados os valores obtidos de células de linfonodos inguinais de camundongos saudáveis (grupo CTRL).

c. Produção de citocinas

Outro parâmetro imunológico importante na imunopatogênese da EAE é a produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias frente ao antígeno específico. Nesse sentido, os resultados indicam que células oriundas de órgãos linfoides secundários de animais do grupo EAE/Ceto podem estar mais ativadas.

Comparando-se a produção *in vitro* de citocinas por células dos linfonodos estimuladas com MOG dos 3 grupos experimentais avaliados notou-se níveis significativamente maiores de TNF- α ($p= 0,04$), IL-6 ($p= 0,008$), IFN- γ ($p= 0,02$) e IL-17 ($p= 0,003$) nas culturas de células dos animais do grupo EAE/Ceto em relação ao grupo CTRL. Com relação ao grupo EAE, a produção destas citocinas foi em geral menor que a observada no grupo EAE/Ceto. Entre as citocinas com potencial anti-inflamatório na doença (IL-5 e IL-10) não foram observadas diferenças nos níveis de produção entre os grupos avaliados (**figura 10**).

Níveis aumentados de IL-6 ($p= 0,01$), IL-17 ($p < 0,0001$) e IL-10 ($p= 0,013$) foram detectados nas culturas de células esplênicas estimuladas com MOG dos animais EAE/Ceto em comparação aos grupos CTRL e EAE. O grupo EAE/Ceto também diferiu de modo estatisticamente significativo do grupo CTRL na análise de produção de IL-5 por estas células ($p= 0,016$). Com relação à produção de TNF- α e IFN- γ por células esplênicas, detectou-se níveis significativamente maiores nas culturas dos grupos EAE e EAE/Ceto em relação ao grupo CTRL ($p= 0,0007$ e $p= 0,0002$, respectivamente) (**figura 11**).

Os níveis séricos de citocinas também podem contribuir para o entendimento dos fenômenos imunopatológicos da EAE. Nestas avaliações detectou-se menor nível sérico de IL-6 no soro de animais do grupo EAE/Ceto e CTRL com relação ao grupo EAE ($p= 0,049$). Na análise dos níveis séricos de IFN- γ observou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos EAE e CTRL ($p= 0,014$) e uma tendência de menores níveis desta citocinas no soro de animais do grupo EAE/Ceto em relação ao grupo EAE. Os nível séricos de TNF- α , IL-17, IL-4 e IL-10 foram semelhantes entre os grupos (**figura 12**).

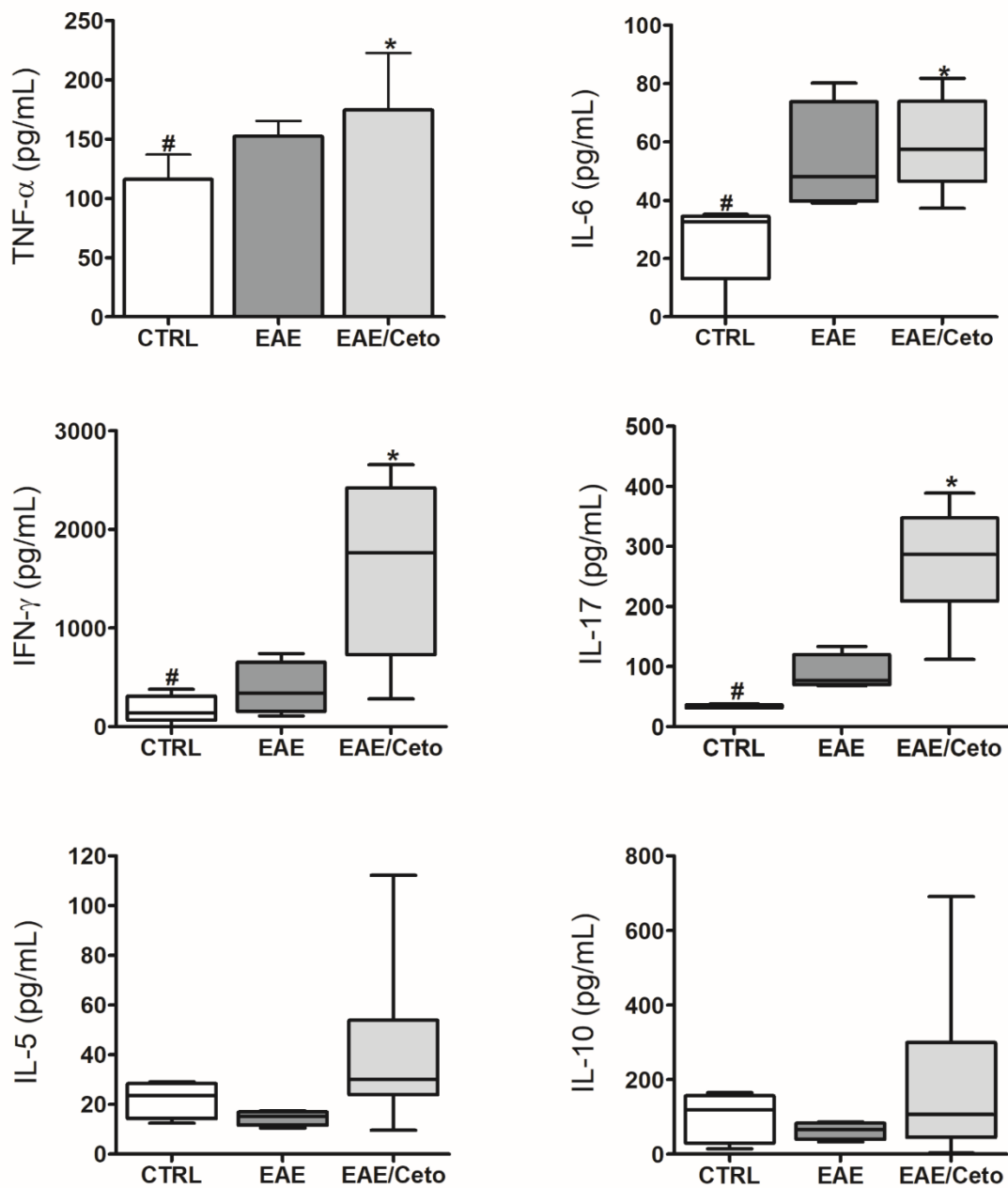


Figura 10. Efeito do cetotifeno na produção de citocinas por células de linfonodos. Células dos linfonodos inguinais e braquiais foram reestimuladas *in vitro* com MOG por 48 horas e as citocinas dosadas nos sobrenadantes por ELISA. Comparação dos níveis de TNF- α realizadas através do teste ANOVA *one-way* ($p=0,04$) e de IL-6 ($p=0,008$), IFN- γ ($p=0,02$), IL-17 ($p=0,003$), IL-5 e IL-10 por meio do teste de Kruskal-Wallis. Dados obtidos a partir de 3 experimentos independentes. Símbolos diferentes representam significância estatística entre os grupos.

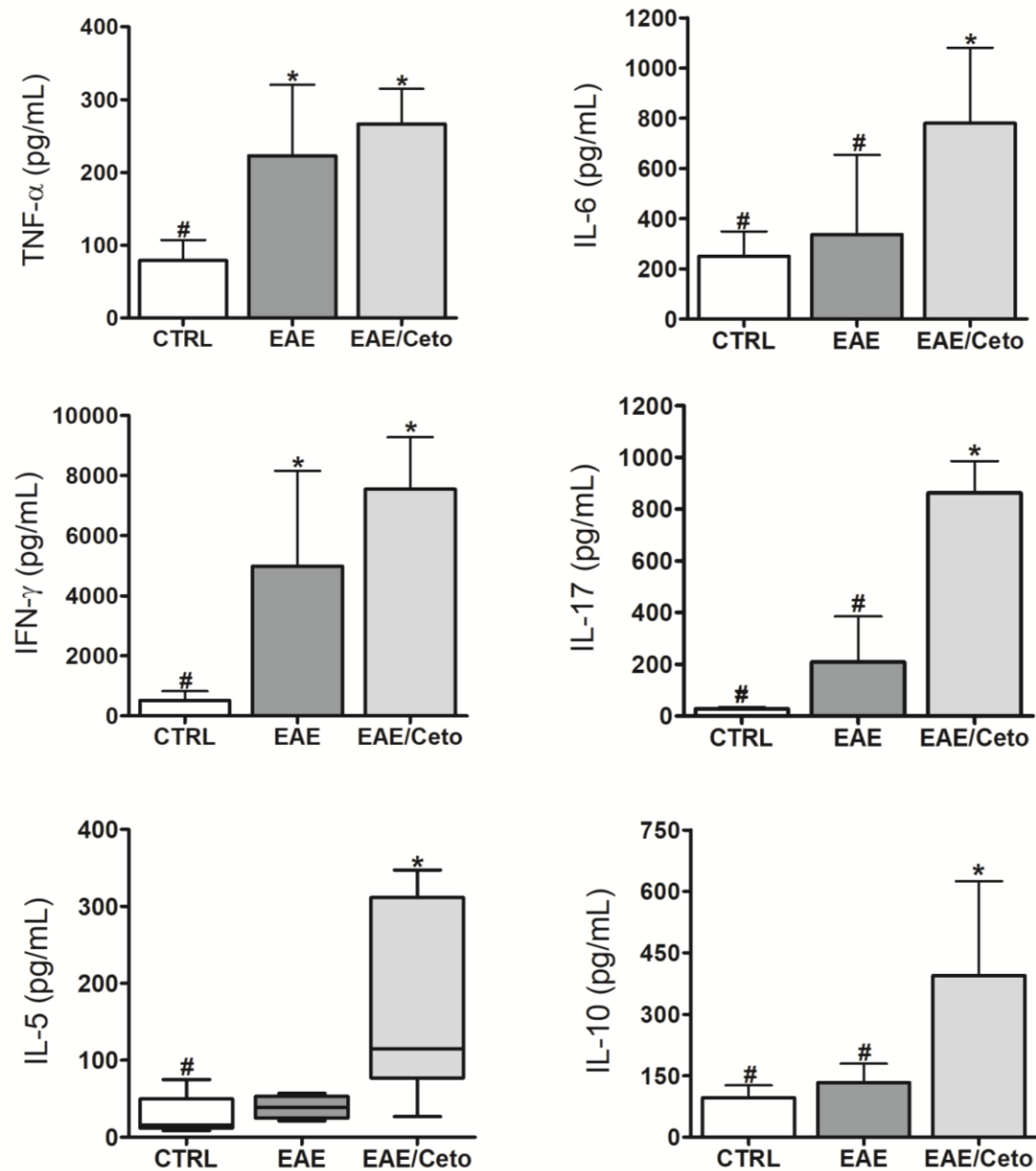


Figura 11. Efeito do cetotifeno na produção de citocinas por células esplênicas. Células esplênicas foram reestimuladas *in vitro* com MOG por 48 horas e as citocinas dosadas nos sobrenadantes por ELISA. Comparação dos níveis de TNF- α ($p=0,0007$), IL-6 ($p=0,01$), IFN- γ ($p=0,0002$), IL-17 ($p<0,0001$) e IL-10 ($p=0,01$) realizadas através do teste ANOVA *one-way* e de IL-5 ($p=0,02$) por meio do teste de Kruskal-Wallis. Dados obtidos a partir de 3 experimentos independentes. Símbolos diferentes representam significância estatística entre os grupos.

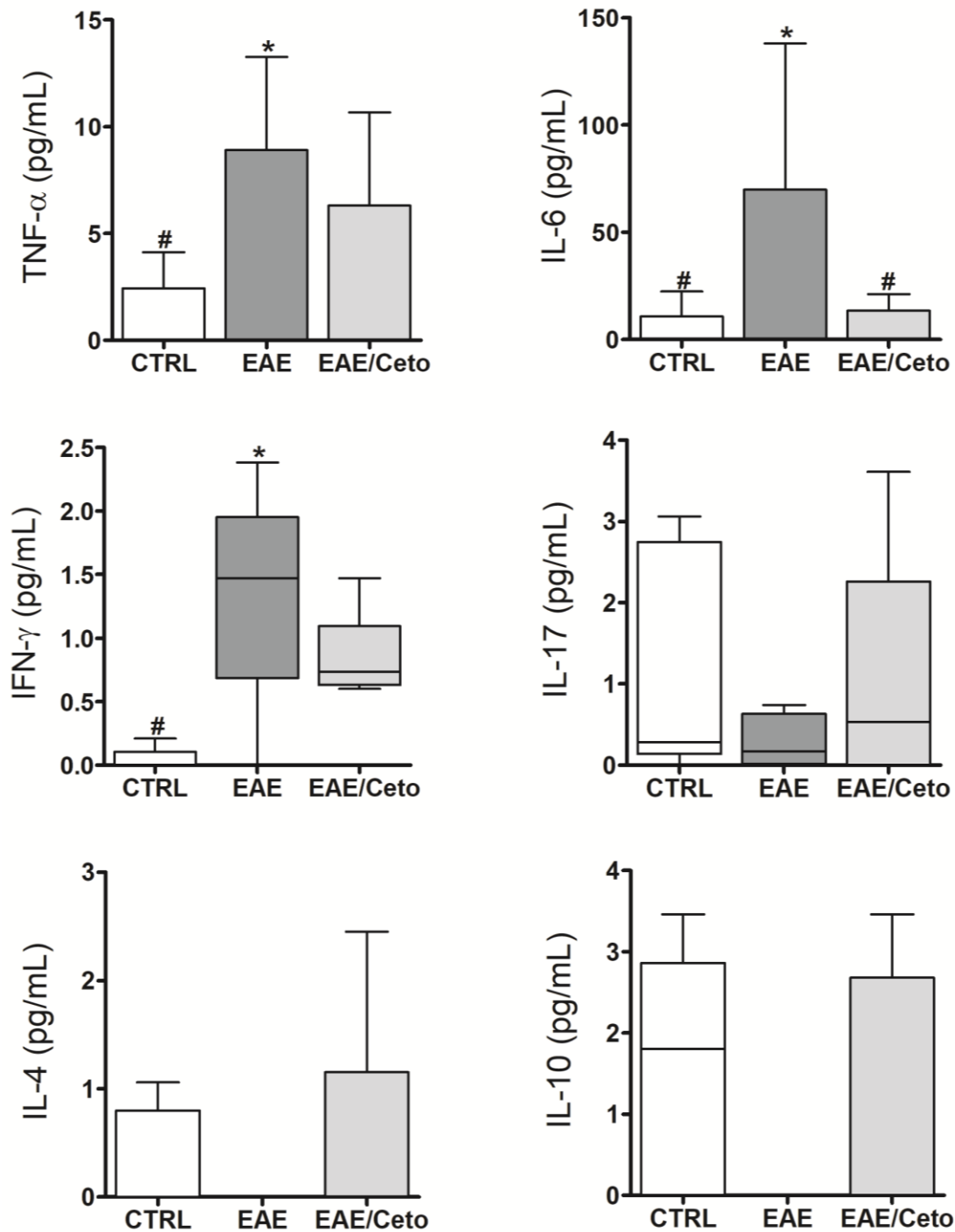


Figura 12. Efeito do tratamento com cetotifeno no nível de citocinas séricas. Comparação dos níveis de TNF- α ($p=0,05$), IL-6 ($p=0,049$) e IL-4 realizadas através do teste ANOVA *one-way* e de IFN- γ ($p=0,01$), IL-17 e IL-10 por meio do teste de Kruskal-Wallis. Dados obtidos do soro de 5 animais dos grupos CTRL e EAE, e de 6 animais do grupo EAE/Ceto. Símbolos diferentes representam significância estatística entre os grupos.

4.3 Alterações no sistema nervoso central

a. Análise histopatológica

A análise histopatológica do SNC, em especial do segmento lombar da medula espinhal, é um parâmetro classicamente utilizado como indicativo da gravidade do processo inflamatório autoimune. Como esperado e ilustrado na **figura 13**, a morfologia desta porção da medula espinhal estava totalmente preservada nos animais normais (grupo CTRL). Neste caso observamos substância branca localizada externamente, a qual contém células da glia e axônios mielinizados, com aspecto rendilhado, devido a retirada da mielina durante o processamento histotécnico, formando espaços negativos. A substância cinzenta, em forma de H e contendo corpos dos neurônios e células gliais, também pôde ser observada na porção central do tecido. Também foram observados vasos sanguíneos cortados transversalmente no parênquima do órgão e na região das leptomeninges.

A análise histopatológica deste segmento nos animais com EAE confirmou a presença de infiltrado inflamatório mononuclear, de moderado a acentuado, na periferia do tecido. Em alguns cortes também constatamos infiltrado inflamatório no parênquima do órgão (**figura 13**). Como a administração de cetotifeno determinou uma drástica redução na incidência da EAE (27% de incidência em comparação com 84% de incidência nos animais do grupo EAE), analisamos, separadamente, o infiltrado inflamatório nos animais sadios e doentes do grupo EAE/Ceto. Os resultados observados no grupo EAE/Ceto sadios também estão ilustrados na **figura 13** e indicam que estes animais não apresentam infiltrado inflamatório no SNC. Por outro lado, os animais do grupo EAE/Ceto que desenvolveram a doença, apesar de serem em número reduzido, apresentaram um processo inflamatório similar ao observado no grupo EAE (**figura 13**).

Os infiltrados inflamatórios foram avaliados semi-quantitativamente e revelaram diferenças significativas. Nesta análise, o grupo EAE apresentou escore significativamente maior que o observado nos grupos CTRL e EAE/Ceto (**figura 13D**). Comparando-se os grupos EAE e o grupo EAE/Ceto integralmente (sem doença e doentes), também foi detectada diferença (**figura 13E**).

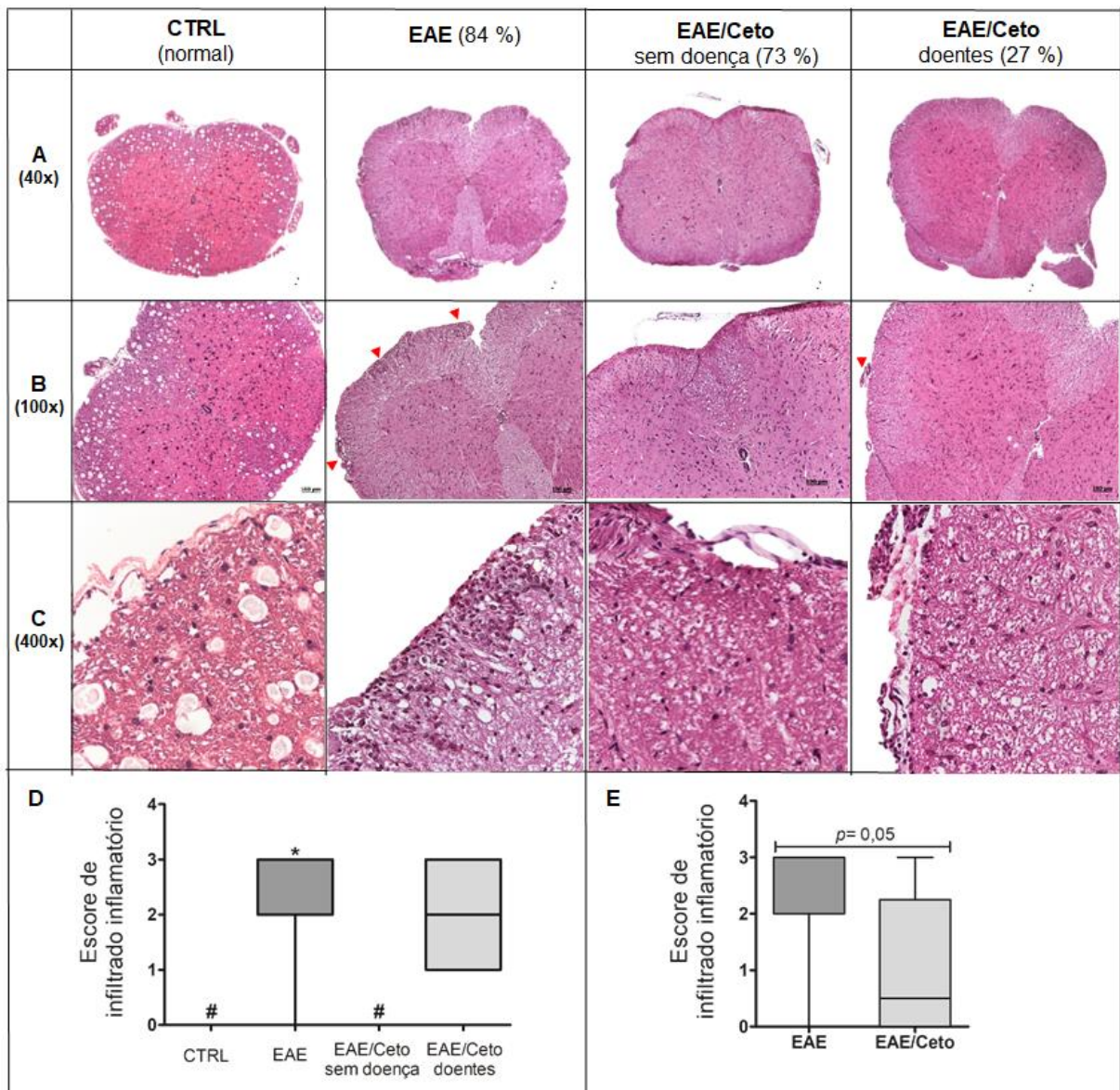


Figura 13. Fotomicrografias de cortes histológicos da medula espinhal. O segmento lombar da medula espinhal de animais dos grupos CTRL (n=5), EAE (n=8) e EAE/Ceto (n=10) foi analisado através de cortes histológicos transversais corados com hematoxilina/eosina. São mostrados aumentos finais de 40x (A), 100x (B) e 400x (C). Os escores dos infiltrados inflamatórios foram comparados através do teste de Kruskal-Wallis ($p = 0,002$) entre os grupos CTRL, EAE e EAE/Ceto (animais tratados com cetotifeno com e sem escore clínico foram analisados separadamente) (D). A comparação dos escores de infiltrado inflamatório envolvendo somente os grupos EAE e EAE/Ceto total (sem doença e doentes) foi realizada pelo teste de Mann-Whitney (E). Símbolos diferentes representam significância estatística entre os grupos.

b. Ativação da micróglia

É descrito que a micróglia contribui para a inflamação e o dano axonal que ocorrem na EM e EAE. O layout da análise das micróglia é mostrado na **figura 14**. Detectamos percentual similar de micróglia totais (células $CD45^{low}CD11b^{+}$) e micróglia ativadas ($CD45^{low}CD11b^{+}MHCII^{+}$) nos cérebros de animais dos grupos EAE e EAE/Ceto (**figuras 15A e 15B**). No entanto, a intensidade de expressão da molécula MHC II é significativamente menor nas células oriundas dos cérebros de animais do grupo EAE/Ceto (**figura 15C**).

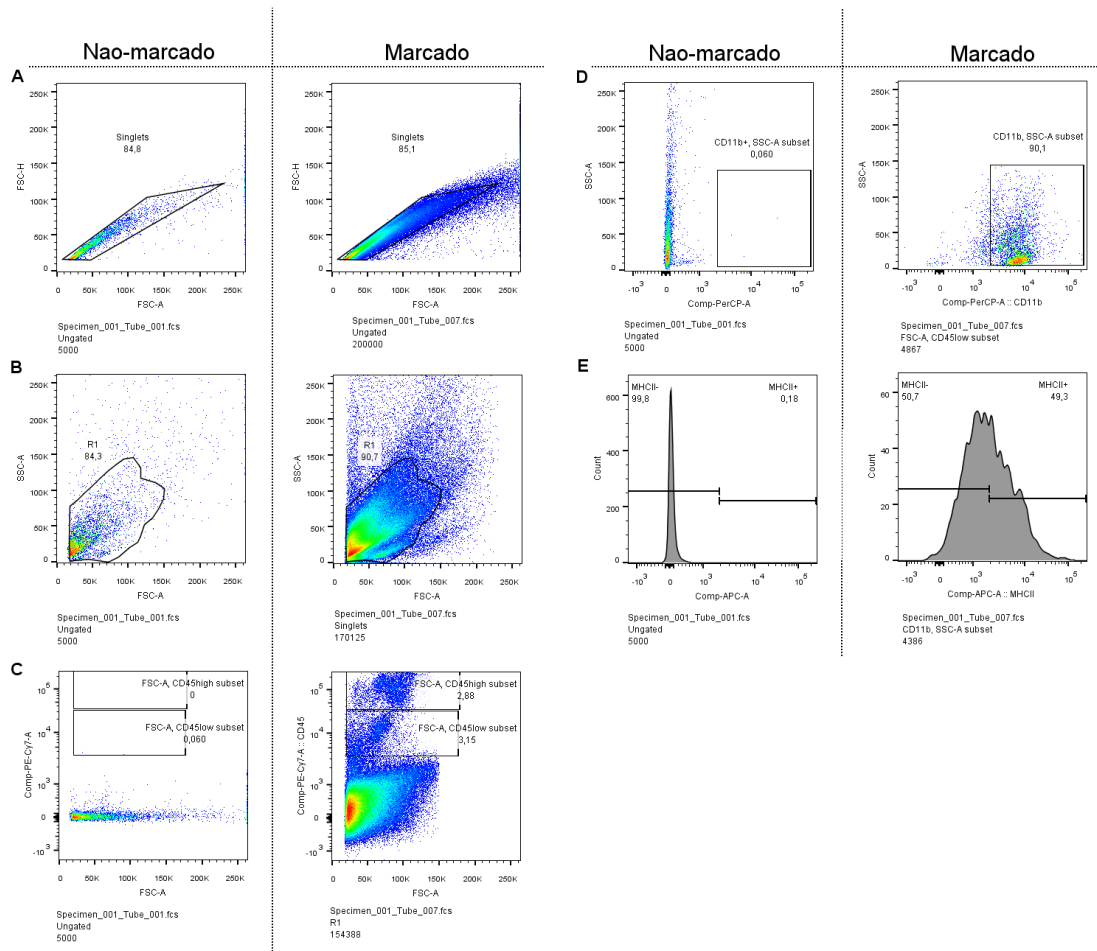


Figura 14. Layout da análise de micróglia ativadas em células eluídas do SNC de animais dos grupos EAE e EAE/Ceto. A figura mostra a comparação das *gates* na análise de células sem marcações e de células marcadas com anti-CD45-PECy7, anti-CD11b-PerCP e anti-MHCII-APC. Em (A) observa-se a delimitação de células individualizadas (*singlets*). Em (B) está a circunscrição da população através do tamanho e granulosidade (*gate* R1). Da população R1 foram separadas as células CD45^{high} e CD45^{low} (C). Em (D) foram delimitadas as *gates* das células CD45^{low} positivas para o marcador CD11b (micróglia totais) e em (E) estão representados os parâmetros para análise de micróglia ativadas (CD45^{low}CD11b⁺ MHCII⁺). Eventos (100.000) adquiridos em citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton Dickinson, California, USA) e análises realizadas no software FlowJo (TreeStar, Oregon, USA).

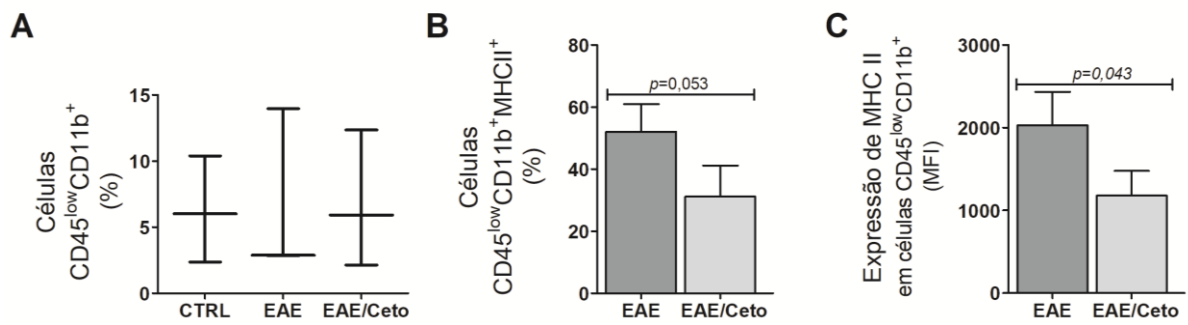


Figura 15. Efeito do cetotifeno sobre o número total de células da micróglia e expressão de MHCII. Os percentuais de micróglia (CD45^{low}CD11b⁺) nos cérebros dos animais do grupo CTRL (n=3), EAE (n=3), EAE/Ceto (n=3) foram comparados (A). Nos animais submetidos à EAE, comparou-se também os percentuais de micróglia ativadas (CD45^{low}CD11b⁺MHCII⁺) (B) e a intensidade de expressão deste marcador (C). Comparação estatística por meio do teste Kruskal-Wallis (A) e teste T (B e C). Eventos (100.000) foram adquiridos em citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton Dickinson, *California, USA*) e análises realizadas no software FlowJo (TreeStar, *Oregon, USA*).

c. Subpopulações de linfócitos

Para esclarecer as alterações detectadas no infiltrado inflamatório observado na análise histopatológica do SNC, linfócitos T foram quantificados por citometria e a expressão de fatores de transcrição/ receptores nucleares relacionados com subpopulações de linfócitos T analisada por RT-PCR. O layout da análise de linfócitos oriundos do SNC por citometria de fluxo está esclarecido na **figura 16**.

A comparação do número de células com morfologia linfocitária típica demonstrou que os cérebros dos animais do grupo EAE possuem, em média, duas vezes mais células que os cérebros dos animais do grupo EAE/Ceto. Os valores médios obtidos foram de 229500 e 98000, respectivamente (**figura 17A**). A análise por citometria de fluxo demonstrou que o cérebro dos animais do grupo EAE/Ceto possuem percentuais significativamente menores de células imunes infiltrantes ($CD45^{hi}$) e de linfócitos T ($CD45^{hi}CD3^{+}$) que suas contrapartes do grupo EAE (**figura 17B e 17C**). Em relação aos percentuais de linfócitos T auxiliares ($CD45^{hi}CD3^{+}CD4^{+}$) e T citotóxicos ($CD45^{hi}CD3^{+}CD8^{+}$), os grupos não apresentaram diferenças significativas (**figuras 17D e 17E**), embora, interessante, os percentuais de linfócitos T citotóxicos obtidos de animais imunizados e tratados tenderem a ser maiores que aqueles obtidos do grupo EAE. O número estimado de cada tipo celular avaliado foi calculado conforme realizado nas análises de subpopulações de linfócitos nos linfonodos (**subitem 4.2a**). Nas comparações destes dados, observou-se que, em relação às células imunes infiltrantes ($CD45^{hi}$), linfócitos T ($CD45^{hi}CD3^{+}$) e T auxiliares ($CD45^{hi}CD3^{+}CD4^{+}$), os números estimados para o grupo EAE/Ceto foram significativamente menores que os números estimados para o grupo EAE (**figuras 17F, 17G e 17H**).

A expressão dos transcritos (mRNA) T-bet, GATA-3, ROR- γ t e Foxp3 nas amostras de medula de cada grupo experimental (EAE e EAE/Ceto) confirmam as diferenças relacionadas com a presença de infiltrado inflamatório nos SNC dos animais dos diferentes grupos (**figuras 18A e 18B, respectivamente**). A expressão dos mRNA T-bet e GATA-3 foi significativamente menor na medula espinhal de animais do grupo EAE/Ceto em relação aos dados obtidos do grupo EAE (**figuras 18C e 18D, respectivamente**). Já a expressão de ROR- γ t foi similar (**figura 18E**). A comparação dos dados de Foxp3 dos grupos EAE e EAE/Ceto resultou num valor de $p=0,0589$, sugerindo que a análise de mais amostras pode resultar em diferença significativa entre estes dados (**figura 18F**). Os valores obtidos pela divisão de T-bet/GATA-3 e Foxp3/ROR- γ t, os quais representam o balanço entre as respostas Th1/Th2 e Treg/Th17, também evidenciaram diferenças no infiltrado inflamatório presente nas medulas dos animais do grupo EAE e EAE/Ceto (**figuras 18G e 18H, respectivamente**).

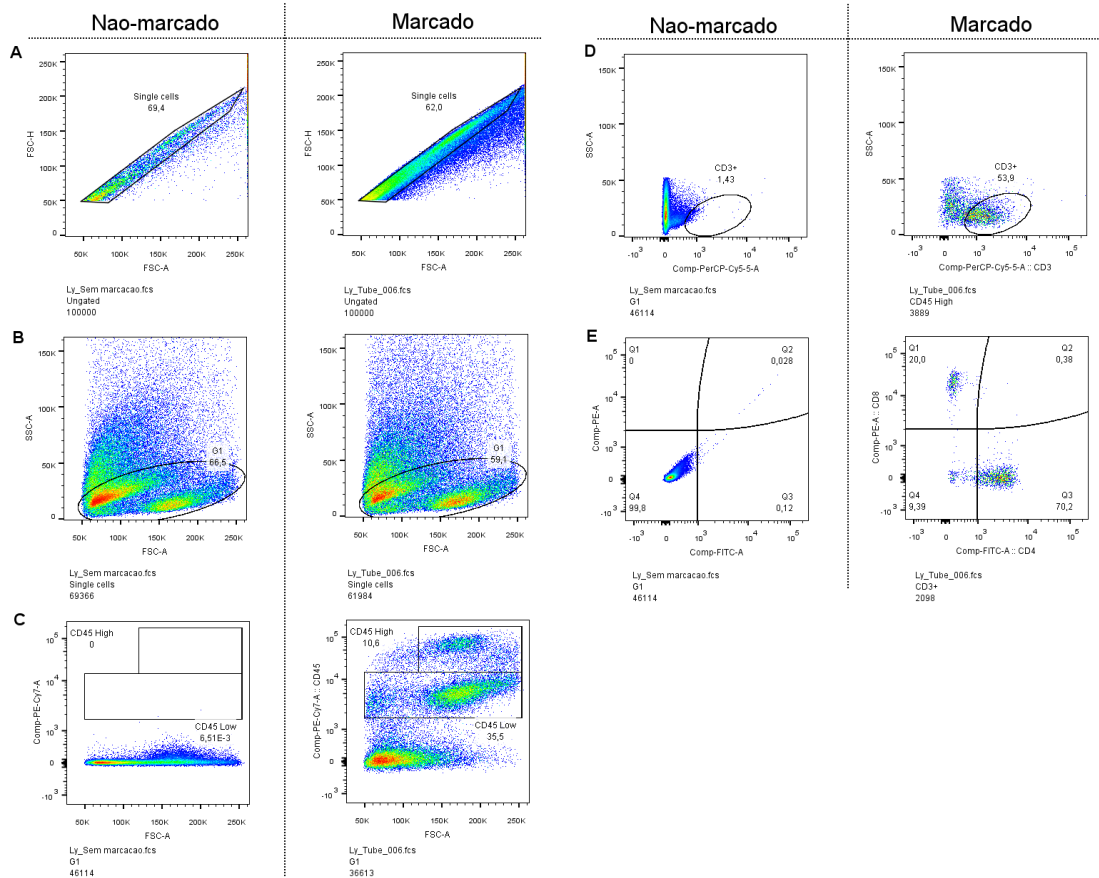


Figura 16. Layout da análise de linfócitos T totais (CD3⁺), T auxiliares (CD4⁺) e T citotóxicos (CD8⁺) em células eluídas do SNC de animais dos grupos EAE e EAE/Ceto. A figura mostra a comparação das *gates* na análise de células sem marcações e de células marcadas com anti-CD45-PeCy7, anti-CD3-PerCP, anti-CD4-FITC e anti-CD8-PE. Em (A) observa-se a delimitação de células individualizadas (*singlets*). Em (B) está a circunscrição da população através do tamanho e granulosidade (*gate* G1). Da população G1 foram separadas as células CD45^{high} e CD45^{low} (C). Em (D) foram delimitadas as *gates* das células CD45^{high} positivas para o marcador CD3 (T totais) e em (E) estão representados os parâmetros para análise de células CD4⁺ (T auxiliares) e CD8⁺ (T citotóxicos). Eventos (100.000) adquiridos em citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton Dickinson, California, USA) e análises realizadas no software FlowJo (TreeStar, Oregon, USA).

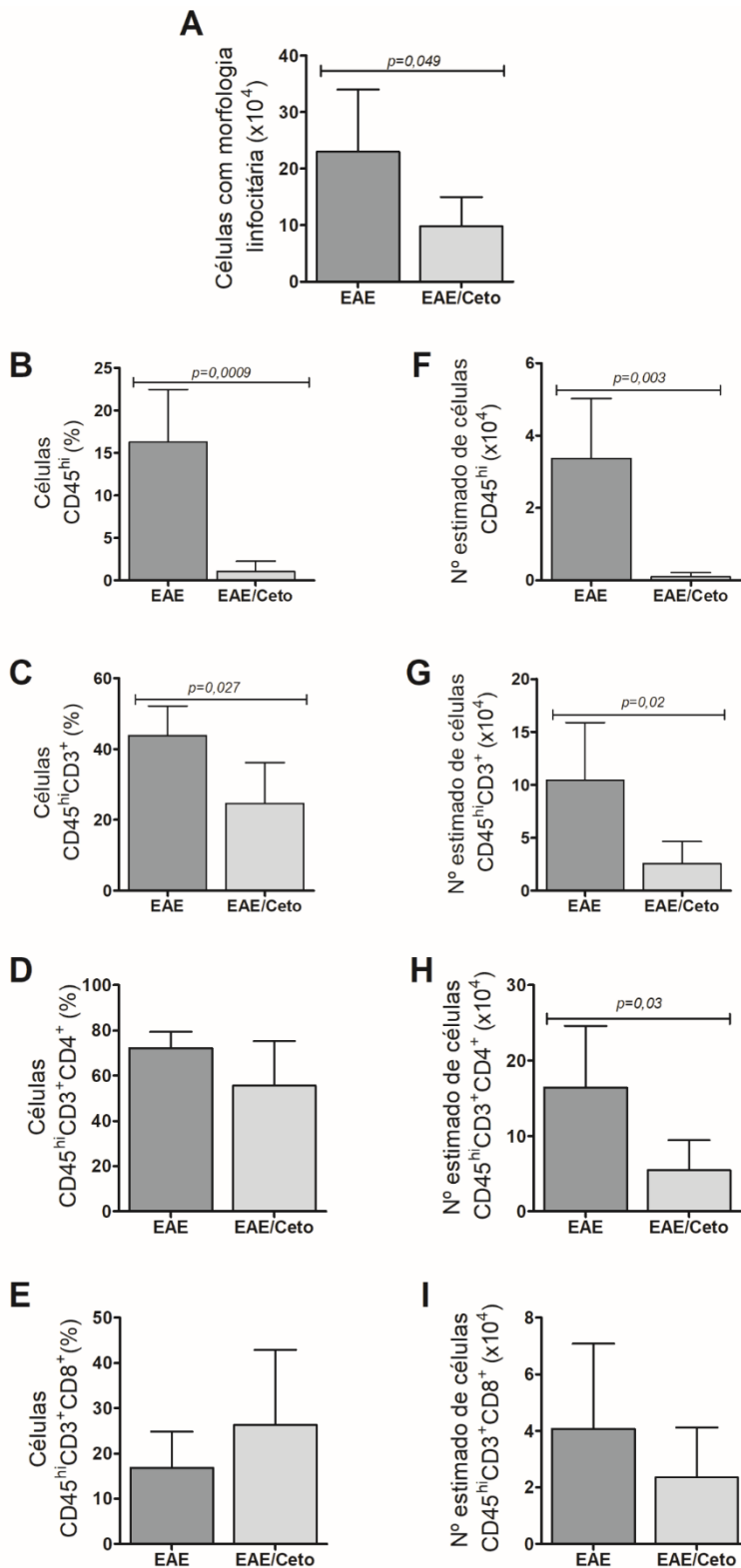


Figura 17. Efeito do cetotifeno na infiltração de linfócitos T no SNC. O número total de células com morfologia linfocitária típica obtidas dos cérebros dos animais dos grupos EAE (n=4) e EAE/Ceto (n=5) após 18 dias da indução da EAE foi comparado (A), bem como o percentual de células CD45^{high} (B), linfócitos CD45^{high}CD3⁺(C), CD45^{high}CD3⁺CD4⁺ (D) e CD45^{high}CD3⁺CD8⁺ (E). Um número estimado de células positivas para cada marcador foi calculado a partir do seu percentual de células positivas sobre o número de células com morfologia linfocitária (F-I). Comparação estatísticas realizadas por meio do teste T. Os eventos (100.000) foram adquiridos em citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton Dickinson, California, USA) e analisados no software FlowJo (TreeStar, Oregon, USA).

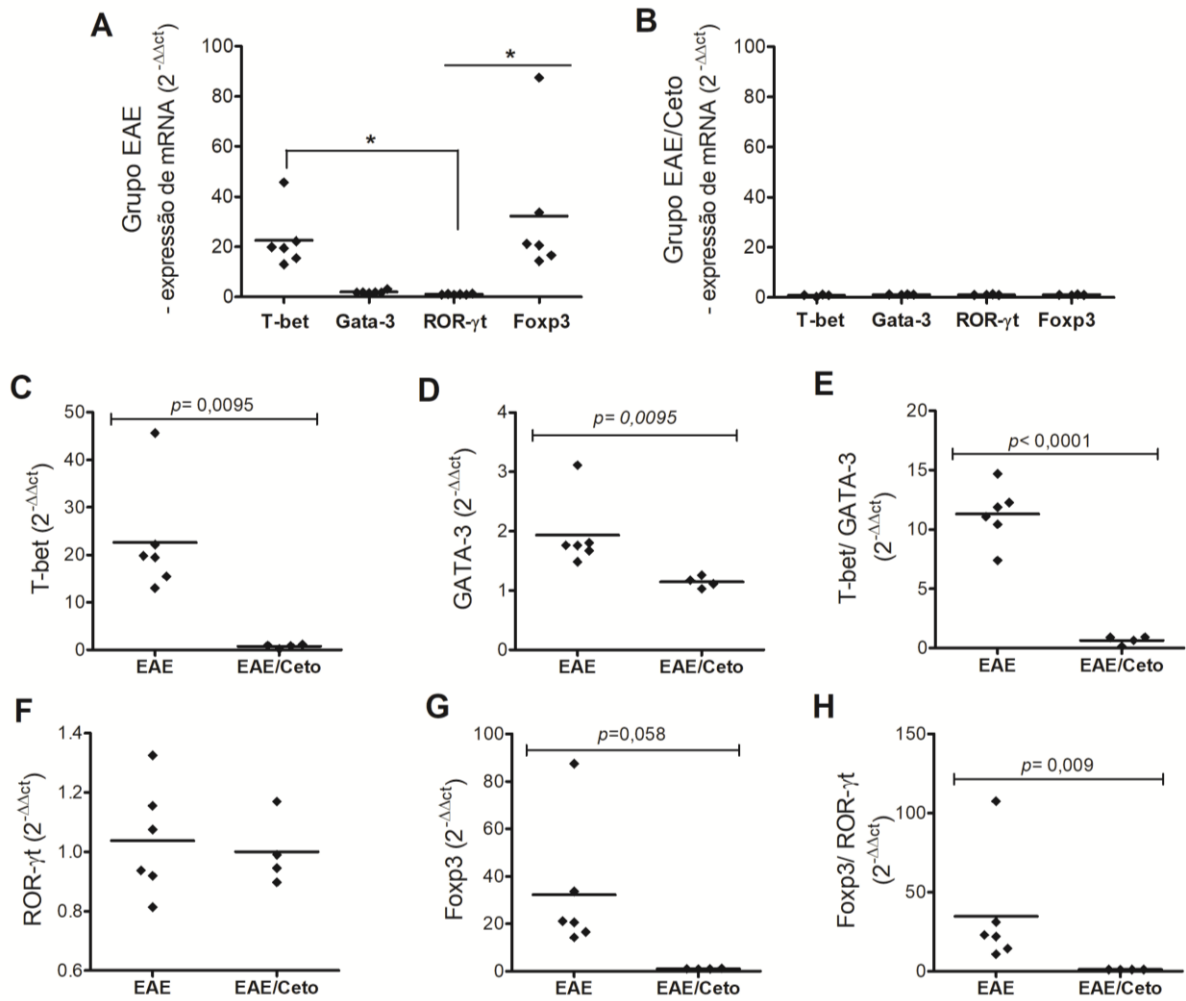


Figura 18. Efeito do cetotifeno na expressão de genes (mRNA) associados às subpopulações de linfócitos T. Os perfis de expressão dos transcritos (mRNA) T-bet, GATA-3, ROR- γt e Foxp3 foram analisados por RT-PCR em amostras de medula espinhal de animais dos grupos EAE (A) e EAE/Ceto (B). Comparações entre estes grupos também foram realizadas em relação a: expressão de T-bet (C), GATA-3 (D) e da razão obtida destes dados (E); expressão de ROR- γt (F), Foxp3 (G) e da razão obtidas destes dados (H). Análises realizadas com amostras de 6 animais do grupo EAE e 5 animais do grupo EAE/Ceto. Os níveis de expressão de mRNA foram representados pelos valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Como calibradores da reação foram utilizados os valores obtidos da análise de células de linfonodos inguinais de camundongos saudáveis (grupo CTRL). Comparações estatísticas realizadas através dos testes de Kruskal-Wallis (A – $*p=0,0002$), ANOVA *one-way* (B), Mann-Whitney (C, D, E, F e H) e teste T (G).

d. Alteração de permeabilidade da barreira hematoencefálica

A alteração da permeabilidade da BHE é um fenômeno fundamental para a entrada de células autorreativas no SNC. Nesse sentido, a manutenção da seletividade desta estrutura poderia resultar na ausência de infiltrado inflamatório no SNC, observada em grande parte dos animais imunizados e tratados com cetotifeno. Nossos resultados demonstraram que incorporação do corante fluorescente NaFlu foi significativamente maior no SNC (medula espinhal e cérebro) dos animais do grupo EAE em relação ao observado nos grupos EAE/Ceto e CTRL (**figura 19A**). As diferenças observadas entre os grupos EAE e EAE/Ceto foram mais contundentes na medula espinhal que no cérebro (**figura 19B e 19C, respectivamente**). Estes dados indicam que o tratamento com cetotifeno previne ou reverte a alteração de barreira hematoencefálica característica do desenvolvimento da EAE.

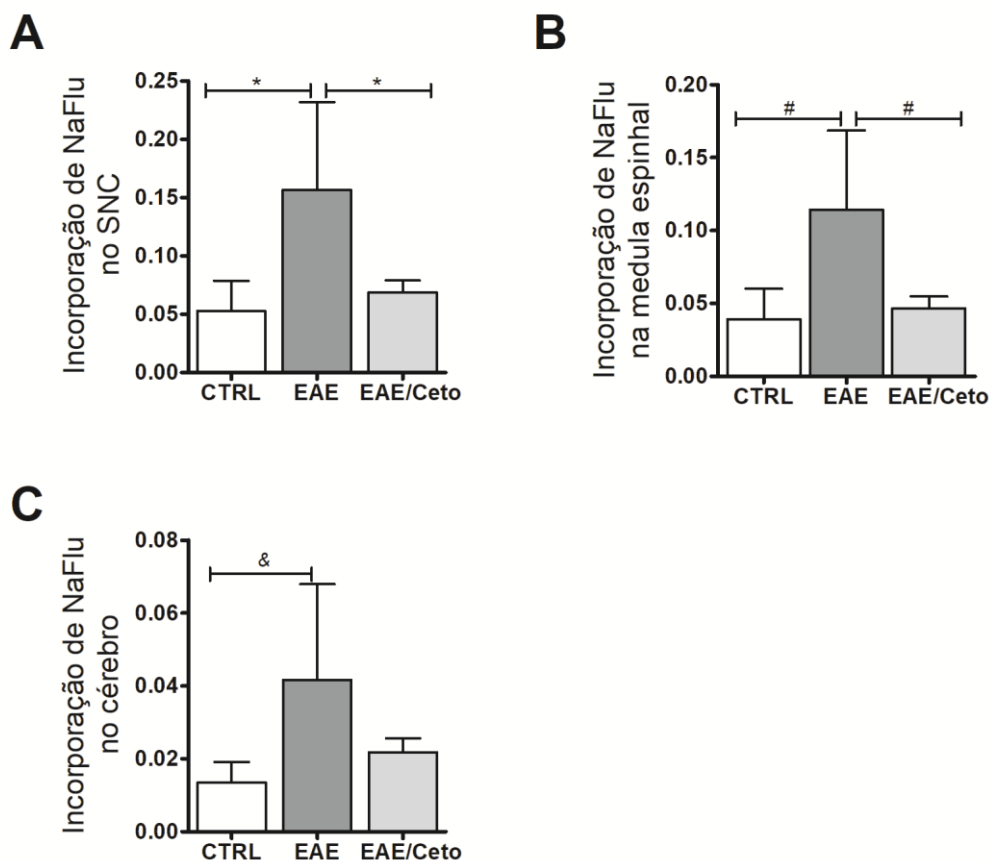


Figura 19. Efeito do cetotifeno sobre a função da barreira hematoencefálica. Onze dias após a indução de EAE, animais dos grupos EAE (n=8) e EAE/Ceto (n=9), bem como animais saudáveis de mesma idade (grupo CTRL, n=3) foram submetidos ao ensaio de incorporação de NaFlu no SNC (medula espinhal e cérebro). Dados do SNC (* $p=0,0035$) (**A**), medula espinhal (# $p=0,025$) (**B**) e cérebro (& $p=0,025$) (**C**) dos grupos CTRL, EAE e EAE/Ceto foram comparados por meio do teste estatístico ANOVA *one-way*.

e. Expressão de enzimas estocadas nos grânulos de mastócitos

Percentuais similares de mastócitos ($CD45^+CD117^+Fc\epsilon RI^+$) foram encontrados nas amostras de SNC dos grupos EAE, EAE/Ceto e CTRL (**Figura 20A**). A expressão de transcritos de proteases específicas de mastócitos foi avaliada em amostras de medula espinhal de animais dos grupos EAE e EAE/Ceto após 18 dias da indução da EAE. Nas comparações destes dados detectou-se que animais que sofreram a indução da EAE e foram tratados com cetotifeno expressam significativamente menos CMA1 e CPA3 em sua medula espinhal que animais do grupo EAE. Importante redução de mMCP4 também pode ser verificada (**Figura 20B**).

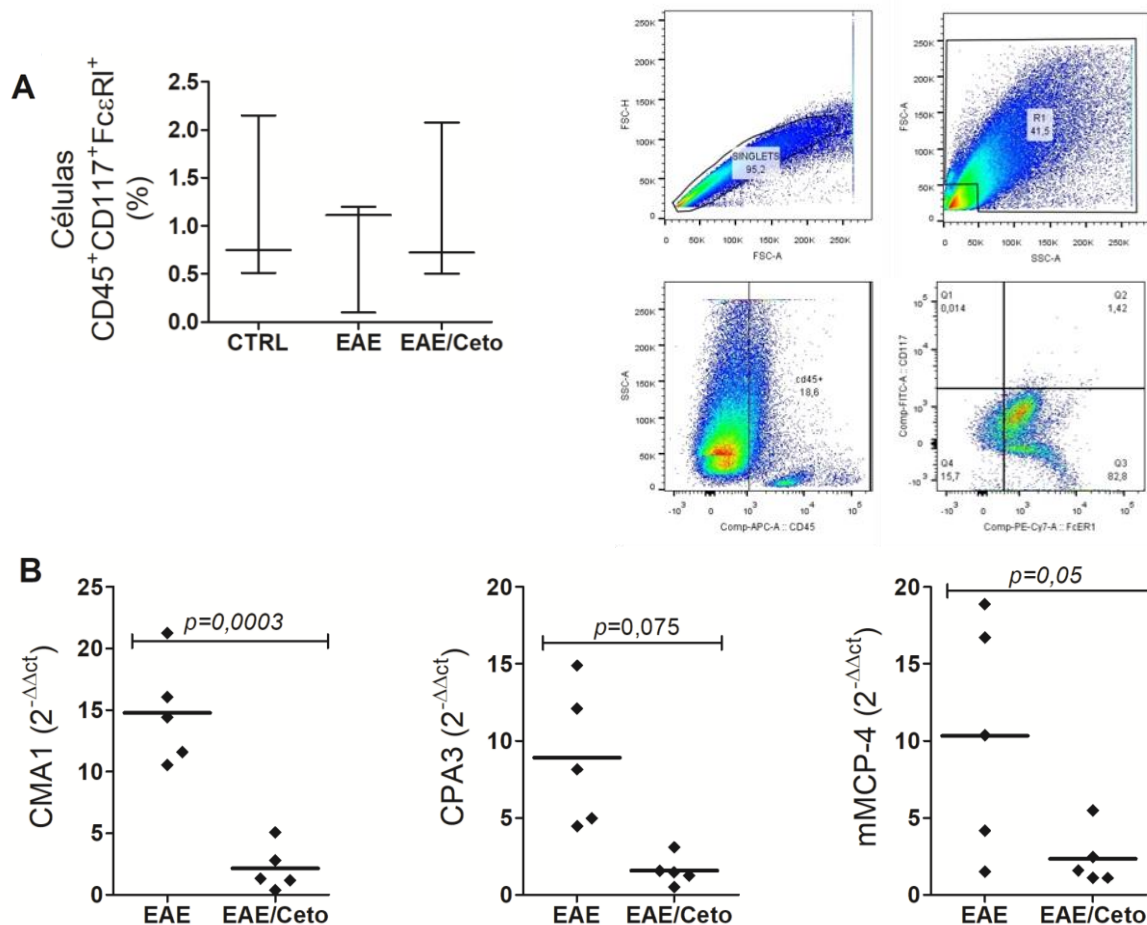


Figura 20. Efeito do cetotifeno na população de mastócitos no SNC e na expressão gênica (mRNA) de proteases estocadas em seus grânulos. A porcentagem de mastócitos (células $CD45^+CD117^+Fc\epsilon RI^+$) presentes nas amostras de SNC de animais dos grupos EAE (n=3), EAE/Ceto (n=3) e CTRL (n=3) foi avaliada por citometria de fluxo segundo o layout demonstrado na figura e comparada pelo teste de Kruskal-Wallis (A). Os eventos (100.000) foram adquiridos em citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton Dickinson, California, USA) e analisados no software FlowJo (TreeStar, Oregon, USA). A expressão dos transcritos (mRNA) CMA1, CPA3 e mMCP4 foi analisada por RT-PCR em amostras de medula espinhal de animais dos grupos EAE e EAE/Ceto e comparadas estatisticamente através do teste T (B). Análises realizadas com amostras de 5 animais de cada grupo avaliado. Os níveis de expressão de mRNA foram representados pelos valores de $2^{-\Delta\Delta ct}$. Como calibradores da reação foram utilizados os valores obtidos da análise de células de linfonodos inguinais de camundongos saudáveis (grupo CTRL).

Discussão

5 DISCUSSÃO

Considerando que os mastócitos podem liberar inúmeros mediadores vasoativos e pró-inflamatórios e que evidências sugerem que estas células podem contribuir com a gravidade de doenças inflamatórias, incluindo a EM (YU; KASPRICK; PETERSEN, 2015), investigamos o efeito do fumarato de cetotifeno (estabilizador de mastócitos) no desenvolvimento da EAE. Para isto, induzimos EAE em camundongos C57BL/6 fêmeas com MOG/CFA na presença de toxina *pertussis* e tratamos os animais diariamente com cetotifeno a partir do 7º dia após a indução da doença.

Os parâmetros clínicos avaliados (peso e escore) indicaram de forma contundente que o cetotifeno protegeu os animais. Esta proteção se caracterizou por baixa incidência da doença, uma vez que somente 27 % dos animais tratados desenvolveram sintomas clínicos em comparação com 84 % do grupo EAE. Mesmo nos animais do grupo tratado que desenvolveram a doença, a mesma foi de menor gravidade. Um efeito protetor similar tem sido descrito para este medicamento em outras patologias experimentais inflamatórias tais como gota (HSU et al., 2016), rinite (LAI et al., 2002) e diabetes (CHEN, Z. et al., 2017; EL-HAGGAR; FARRAG; KOTKATA, 2015). Entre as doenças autoimunes e seus modelos, efeitos benéficos associados ao cetotifeno foram descritos na uveíte autoimune experimental (DE KOZAK et al., 1983) e na tireoidite autoimune (KARAAVVAZ et al., 2002). Este é, portanto, o primeiro relato do efeito protetor do cetotifeno em modelo experimental de EM.

A opção por iniciar o tratamento a partir do 7º dia foi baseada na proposição de que neste período a resposta autoimune já teria sido montada, o que é também confirmado pela literatura (MURPHY et al., 2010). De fato, foram detectadas alterações imunológicas características da imunopatogênese da EAE nos órgãos linfoides periféricos dos animais do grupo EAE/Ceto. Entretanto, apesar do cetotifeno não ter impedido a montagem da resposta imune, a análise destes parâmetros indicou que o tratamento afetou as características desta resposta. De forma geral e não esperada, após 18 dias, os animais tratados com cetotifeno apresentaram maior número de células com morfologia linfocitária nos linfonodos regionais. Macroscopicamente, estes órgãos apresentaram-se aumentados em relação ao observado nos animais do grupo EAE (dados não demonstrado). Juntos, estes dados sugeriam a ocorrência de uma linfadenomegalia nos animais tratados com cetotifeno, a qual poderia estar relacionada com maior proliferação de células nestes órgãos. No entanto, a similaridade na contagem destas células após 12 dias de indução da doença entre os grupos EAE e EAE/Ceto sugeriu que a diferença observada após 18 dias poderia resultar de um acúmulo de células, possivelmente

linfócitos autorreativos, dos linfonodos regionais dos animais do grupo EAE/Ceto. De forma distinta no grupo EAE estas células, possivelmente, seguiram os mecanismos imunopatogênicos da doença, deixando os linfonodos em direção ao SNC, através da circulação (WILSON; WENINGER; HUNTER, 2010). Esta hipótese foi reforçada quando constatamos a existência de uma forte correlação inversa, embora não significativa, entre ausência de infiltrado inflamatório no SNC dos animais do grupo EAE/Ceto que não adoeceram e número aumentado de células em seus linfonodos. Esta análise abrangeu dados de um protocolo experimental, no qual o grupo EAE/CETO continha 3 animais doentes com presença de infiltrado inflamatório no SNC e 3 animais que não desenvolveram a doença e não apresentaram infiltração no tecido nervoso. Como resultado foram obtidos os valores de $r = -0,76$ (coeficiente de correlação) e de $p = 0,076$ (dados não demonstrados). Infelizmente, a dinâmica de execução dos protocolos experimentais não nos permitiu fazer uma análise de correlação que abrangesse grande parte dos animais avaliados neste estudo, a qual poderia confirmar o aspecto evidenciado através de uma análise estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Avaliações *in vivo* de migração de células poderiam confirmar esta hipótese.

Outras avaliações realizadas na periferia confirmaram a presença de linfócitos T reguladores ($CD3^+CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$) e T auxiliares ($CD3^+CD4^+$), bem como de transcritos relacionados às subpopulações Th1, Th2, Th17 e Tregs nos linfonodos regionais dos animais do grupo EAE/Ceto de modo semelhante ao observado nas amostras do grupo EAE. Somente a comparação do percentual de linfócitos T totais ($CD3^+$) por citometria de fluxo resultou em diferença entre estes grupos, com menor percentual destas células nas amostras dos animais tratados com cetotifeno. Considerando os marcadores avaliados é possível que tal diferença resulte de uma diminuição do percentual de linfócitos T $CD8^+$ nos linfonodos regionais do grupo EAE/Ceto. Se confirmada esta diferença, seria interessante investigar se esta redução estaria relacionada com uma ação do cetotifeno sobre estas células ou se ela é decorrente de uma migração destas células para outros locais antes do início do tratamento ou das avaliações, seguindo a dinâmica da fisiopatologia da doença. Poucos estudos têm sido direcionados para a investigação do papel dos linfócitos T citotóxicos na EAE. Embora alguns deles mostrem um papel patogênico destas células na EAE (SALOU; NICOL; et al., 2015), outros sugerem um papel regulador mais proeminente (LEGROUX; ARBOUR, 2015; SINHA et al., 2015). De fato, a associação entre linfócitos T $CD8^+$ e mecanismos imunopatogênicos parece estar mais estabelecida na EM que na EAE (BABBE et al., 2000; SALOU; GARCIA; et al., 2015; SALOU; NICOL; et al., 2015).

A fim de evidenciar que as semelhanças entre os percentuais de linfócitos T auxiliares e Tregs, e o menor percentual de linfócitos de T totais nas amostras dos animais tratados com cetotifeno não contradizem a hipótese de acúmulo de células nos linfonodos regionais destes animais, estimou-se o número de células relativo a cada marcador avaliado por citometria de fluxo com base na contagem células com morfologia linfocitária para cada grupo. De fato, a comparação destes números estimados reforça a hipótese de que os linfonodos regionais dos animais do grupo EAE/Ceto abrigavam mais células. É interessante ressaltar os dados obtidos por citometria de fluxo e o número estimado para o marcador CD3, uma vez que este número foi significativamente maior no grupo EAE/Ceto do que o observado nos linfonodos do grupo EAE, mesmo este número sendo derivado de um percentual significativamente menor para o grupo EAE/Ceto.

Através de citometria de fluxo também foi possível constatar maior percentual de DCs (F4/80⁺CD11c⁺), de DCs expressando MHC II, bem como menor percentual de DCs expressando PD-L1. Possivelmente, estas alterações estão relacionadas com o acúmulo de linfócitos autorreativos nos linfonodos regionais, estimulando células e fatores envolvidos na ativação da resposta imune periférica. De fato, estes dados são coerentes com o papel estimulador e inibidor das moléculas MHC II e PD-L1, respectivamente, no processo de apresentação antigênica (KEIR; FRANCISCO; SHARPE, 2007; WORBS; HAMMERSCHMIDT; FORSTER, 2017). A hipótese de uma ativação intensa nos órgãos linfoides secundários de animais do grupo EAE/Ceto foi reforçada pela produção aumentada de TNF- α , IL-6, IFN- γ e IL-17 frente ao antígeno específico. Pensamos, inicialmente, que esta elevada ativação da resposta imune periférica pudesse ser diretamente determinada pelo efeito do cetotifeno em APCs (processamento e apresentação antigênica), ativação policlonal de linfócitos ou então, sobre a síntese e liberação de citocinas. Entretanto, não encontramos suporte na literatura para esta hipótese. De forma contrária, existem relatos, alguns bastante antigos, ressaltando o papel imunossupressor do cetotifeno. Ilustrando este aspecto foi demonstrado que o cetotifeno inibe a apresentação antigênica com decréscimo concomitante da expressão de moléculas HLA-DQ em macrófagos (KAWANO et al., 1996); que o cetotifeno inibe a resposta proliferativa de linfócitos aos antígenos alimentares (KONDO et al., 1994) e que também determinou um efeito supressor na liberação de quimiocinas por monócitos (HUNG et al., 2007).

Alternativamente, consideramos que o acúmulo de células na periferia estaria relacionado a um efeito similar ao descrito para o Fingolimod (FTY720), a primeira droga oral aprovada para o tratamento de RR-EM (CAVONE et al., 2015; COCLITU et al., 2016;

DEVONSHIRE et al., 2012; KAPPOS et al., 2006). Segundo Brinkmann e colaboradores (2010), o FTY720 diminui a expressão dos receptores S1P1 nos linfócitos, o que resulta na retenção dos linfócitos T autorreativos nos linfonodos, impedindo a invasão do SNC. Nossos resultados são coerentes com esta possibilidade e, neste sentido, será bastante esclarecedor investigarmos o nível de expressão dos receptores S1P1 nos linfócitos dos animais deste grupo .

Outras moléculas e receptores estão envolvidos com o *homing* e migração celular e poderiam ocasionar o sequestro de linfócitos nos linfonodos de animais tratados com cetotifeno. Esta hipótese está temporalmente de acordo com os mecanismos imunopatogênicos que ocorrem no período em que os animais foram tratados com a droga (ANGIARI, 2015). A interação entre linfócitos efetores e Tregs via CTLA-4 constitui um dos mecanismos que poderiam limitar a interação com DCs apresentando auto-antígenos e, conseqüentemente, afetar a ativação e migração destas células nas fases iniciais do desenvolvimento da EAE (ANGIARI, 2015; DEJEAN et al., 2009; WING et al., 2008). No presente estudo a expressão de CTLA-4 não foi avaliada. No entanto, os percentuais de Tregs e os níveis de expressão de Foxp3 foram similares nos linfonodos de animais dos grupos EAE e EAE/Ceto. Outro aspecto constatado que contrapõe esta possibilidade é a elevada produção de citocinas pelas células dos linfonodos do grupo EAE/ceto, uma vez que tem sido demonstrado que a expressão de CTLA-4 em Tregs suprime a produção de IL-6 e TNF- α por DCs (DEJEAN et al., 2009; WING et al., 2008).

Selectinas e integrinas são outros exemplos de moléculas envolvidas na migração celular e entrada de linfócitos no SNC que poderiam ser afetadas por drogas imunomoduladoras, como parece ser o cetotifeno (ANGIARI, 2015; LOPES PINHEIRO et al., 2016). No contexto da EM, os efeitos protetores do tratamento com Natalizumab, um anticorpo monoclonal humanizado que se liga à integrina-4 α , estão associados ao bloqueio da entrada de linfócitos no SNC via BHE (COCLITU et al., 2016). Polimorfismos relacionados à selectina-E e PSGL-1 (ligante 1 da glicoproteína P-selectina) um dos principais ligantes das selectinas, o qual é expresso por leucócitos circulantes, são encontrados em portadores de EM, nas formas clínicas RR- e PP-EM (GALIMBERTI et al., 2005; RAO et al., 2002). Na EAE foi demonstrado que a transferência adotiva de linfócitos específicos para MBP previamente incubados com anticorpos anti-PSGL-1 resultou em doença menos grave que a induzida por linfócitos incubados com isótipo controle (DESHPANDE; KING; SEGAL, 2006). Por outro lado, Sathiyandan e colaboradores (2014) demonstraram que PSGL-1 e selectinas-E e -P são importantes para o rolamento de linfócitos em tecidos inflamados da medula espinhal, mas não

são essenciais para a entrada destas células no parênquima do SNC, o que sugere o envolvimento de outros mecanismos (SATHIYANADAN et al., 2014).

Como citado anteriormente, a grande maioria dos animais submetidos ao tratamento com cetotifeno não desenvolveu sinais de paralisia e também não apresentou infiltrados inflamatórios na análise histopatológica convencional. Por outro lado, os poucos animais tratados com cetotifeno que desenvolveram sintomatologia apresentaram um processo inflamatório no SNC que diferiu estatisticamente do avaliado nas medulas lombares dos animais do grupo EAE. As análises comparativas do número de células com morfologia linfocitária, do percentual de células imunes infiltrantes (CD45^{hi}) e de linfócitos T totais, do número estimado destas células e de linfócitos T auxiliares, bem como da expressão de transcritos relacionados às subpopulações Th1, Th2, Th17 e Treg no SNC confirmaram que o tratamento com cetotifeno afetou a entrada de células nos tecidos-alvo da doença. Vale ressaltar que estas análises foram realizadas incluindo todos os animais do grupo EAE/Ceto, sem distinção entre animais que adoeceram ou não, o que possivelmente resultou em uma redução destes parâmetros e não ausência total dos mesmos. Para que estas análises pudessem ser feitas separadamente o número total de animais utilizados teria que ser maior.

Estes resultados foram ainda reforçados pela quantificação e análise da ativação de células da micróglia. Nos animais tratados com cetotifeno tanto o percentual como o estado de ativação destas células estavam reduzidos. Estas características podem estar associadas indiretamente à ação do cetotifeno, ou seja, menor proliferação e menor ativação destas células em função da ausência ou menor intensidade do processo inflamatório. A contribuição das células da micróglia, tanto do ponto de vista deletério quanto protetor, tem sido amplamente discutida (BOGIE; STINISSEN; HENDRIKS, 2014; RAWJI; YONG, 2013). Neste sentido, dados não demonstrados, obtidos recentemente em nosso laboratório, corroboram este efeito indireto, pois indicam que o tratamento com cetotifeno, após o primeiro surto desta doença em camundongos SJL fêmeas, não é capaz de modular o desenvolvimento clínico na EAE. A literatura mostra que durante estes surtos, os fenômenos inflamatórios observados estão mais associados à ativação prévia da micróglia e de células que infiltraram no início da patogênese do que com o rompimento da BHE e nova invasão por leucócitos (DENDROU et al., 2015; DI FILIPPO et al., 2016).

De fato, os resultados demonstram que bloqueio da formação do infiltrado inflamatório no SNC é o mecanismo central da proteção determinada pelo cetotifeno, um achado bastante condizente com a relevância dos linfócitos na neuroinflamação e no dano tecidual que gera a sintomatologia da EAE e da EM (CHIUSO-MINICUCCI et al., 2015; DENDROU et al., 2015;

FLETCHER et al., 2010; LASSMANN; BRADL, 2017; PROCACCINI et al., 2015). Embora os fenômenos envolvidos com *homing* e migração celular possam estar relacionados com este efeito protetor determinado pelo cetotifeno na EAE, dados publicados acerca da participação dos mastócitos na imunopatogênese desta doença sugerem que a ausência da liberação de alguns mediadores por estas células poderia afetar a entrada dos linfócitos autorreativos no SNC através da BHE (CHRISTY et al., 2013; RUSSI; WALKER-CAULFIELD; BROWN, 2016; RUSSI; WALKER-CAULFIELD; GUO; et al., 2016).

Está bem estabelecido que a permeabilização da BHE é etapa fundamental na patogênese da EAE, possibilitando a entrada de proteínas e células no SNC, principalmente de linfócitos autorreativos, os quais desencadeiam a resposta inflamatória neurodegenerativa (LOPES PINHEIRO et al., 2016; MURPHY et al., 2010; WALKER-CAULFIELD et al., 2015). Para investigar se o efeito protetor do cetotifeno estava associado com o bloqueio da permeabilização da BHE, comparamos a integridade desta barreira entre animais dos grupos CTRL, EAE e EAE/Ceto. Estes ensaios foram realizados no 11º dia após a indução da doença, ou seja, em conformidade com a literatura que mostra que a permeabilização da barreira ocorre entre os dias 7 e 14 após a indução da doença (MURPHY et al., 2010; WALKER-CAULFIELD et al., 2015). De fato, os resultados obtidos demonstraram que a BHE dos animais tratados com cetotifeno é significativamente menos permeável, principalmente na região da medula espinhal, que a BHE dos animais do grupo EAE. Além disso, a permeabilidade desta barreira nos animais do grupo EAE/Ceto se mostrou semelhante à observada nos animais normais do grupo CTRL. Considerando que o cetotifeno é uma droga que estabiliza mastócitos, células que também residem no parênquima do SNC e nas meninges (LAMBIASE; MICERA; BONINI, 2009; WADE et al., 2012) é possível que o efeito estabilizador do cetotifeno na BHE se deva à inibição da liberação de TNF- α , citocina estocada nos grânulos destas células e que age sobre distintos componentes da BHE (LAROCHELLE; ALVAREZ; PRAT, 2011; LV et al., 2010; PAN; KASTIN, 2007). Esta possibilidade é suportada pelos achados de Christy e colaboradores (2013), os quais indicam que a produção de TNF- α por mastócitos promove aumento da permeabilidade da BHE durante a patogênese da EAE através do recrutamento de neutrófilos para o local (CHRISTY et al., 2013). Outras células residentes do SNC como as micróglia produzem TNF- α , entretanto os mastócitos são as únicas células que estocam esta citocina em seus grânulos, liberando-a no ambiente rapidamente. Além disso, existem relatos que evidenciam a participação dos mastócitos na regulação da BHE através da liberação de mediadores e enzimas (SKAPER; FACCI; GIUSTI, 2013). Neste cenário, é provável que a ação do cetotifeno na BHE resulte do bloqueio da desgranulação e liberação de mediadores

produzidos *de novo* pelos mastócitos e consequente liberação de TNF- α . Além da regulação da BHE, o TNF- α produzido por mastócitos ativa micrógliia e linfócitos T CD8⁺ (DUDECK et al., 2015; ZHANG et al., 2016), podendo potencializar o perfil inflamatório observado no SNC durante a patogênese da EAE (SOELLNER et al., 2013; WALKER-CAULFIELD et al., 2015).

Outra citocina envolvida com a quebra da função da BHE é a IL-1 β (ARGAW et al., 2006). Sua participação e de outros componentes do inflamassoma nos mecanismos imunopatogênicos da EAE/EM tem sido descrita (revisado por BARCLAY; SHINOHARA, 2017). Recentemente, Russi e colaboradores (2016) demonstraram que a IL-1 β produzida de uma maneira dependente de caspase-1 por mastócitos residentes das meninges induz a expressão de GM-CSF nos linfócitos autorreativos que chegaram nesta região durante a imunopatogênese da EAE. A expressão de GM-CSF por estes linfócitos é crucial para a infiltração no SNC (RUSSI; WALKER-CAULFIELD; BROWN, 2016; RUSSI; WALKER-CAULFIELD; GUO; et al., 2016). Estudos adicionais sugerem a existência de uma retroalimentação entre estas citocinas de forma que o GM-CSF induz a ativação do inflamassoma e produção de IL-1 β (BARCLAY; SHINOHARA, 2017). A produção de IL-1 β por mastócitos, porém de uma maneira independente de caspase-1, também foi implicada na expansão de linfócitos Th17 (SUURMOND et al., 2016), células que também parecem promover a quebra da BHE (HUPPERT et al., 2010). Neste cenário, é possível que a estabilização de mastócitos determinada pelo cetotifeno esteja também impedindo a liberação de IL-1 β o que, conseqüentemente, contribuiria com a manutenção da função da BHE e com o bloqueio do processo inflamatório no SNC. Dados preliminares do nível de expressão de IL-1 β e de outros parâmetros relacionados ao inflamassoma em amostras do SNC confirmam o efeito inibidor do cetotifeno na ativação do inflamassoma.

A possibilidade de que o efeito protetor do cetotifeno se devesse, pelo menos em parte, à sua atividade farmacológica sobre os mastócitos encontra bastante suporte na literatura. Neste sentido são crescentes, por exemplo, as evidências de participação destas células na EAE/EM (ELIEH-ALI-KOMI; CAO, 2016); também se sabe que mastócitos estocam mediadores capazes de interferir na integridade da BHE (CHRISTY; BROWN, 2007) e que o cetotifeno inibe a liberação de mediadores pelos mastócitos (BABA et al., 2016; FINN; WALSH, 2013; WADE et al., 2012). Era necessário, entretanto, comprovar o efeito do tratamento com cetotifeno sobre estas células no SNC. De fato, a constatação de menor expressão gênica de Cma1, CPA3 e mMCP4 em amostras de medula espinhal dos animais do grupo EAE/Ceto em comparação ao grupo EAE permitiu comprovar que o tratamento com cetotifeno afetou o processo de liberação de mediadores pelos mastócitos, uma vez que estas

enzimas são produzidas e armazenadas somente nos grânulos destas células. Desse modo, os resultados obtidos no presente estudo em conjunto com evidências da atuação dos mastócitos na quebra da BHE e entrada de linfócitos autorreativos no SNC sugerem que o cetotifeno exerce efeito protetor no desenvolvimento da EAE através de interação com estas células. O possível efeito deste tratamento no *homing* e migração celular, bem como a ação do cetotifeno em outros tipos celulares merecem ser investigados e podem contribuir com o efeito protetor observado. Na nossa opinião o fato do cetotifeno ser eficaz no controle do desenvolvimento da EAE é relevante por, eventualmente, representar uma estratégia adjuvante no tratamento da EM. Vários aspectos legais e farmacológicos do cetotifeno como a utilização já aprovada em humanos, baixa toxicidade, passagem desta droga pela BHE íntegra e efeitos colaterais pouco nocivos, se comparados às drogas imunossupressoras e imunomoduladoras utilizadas no tratamento da EM (COCLITU et al., 2016; DAMAL et al., 2013; STUVE et al., 2008), podem facilitar a avaliação do cetotifeno em testes clínicos e um futuro uso terapêutico. As informações acerca destes parâmetros e de outros relacionados com o cetotifeno estão disponibilizadas no *DrugBank*, uma base de dados de bioinformática e quimioinformática mantida pela Universidade de Alberta, Edmonton, Canadá (KNOX et al., 2011), no link <<https://www.drugbank.ca/drugs/DB00920#references>>. Novas pesquisas no âmbito da EAE devem contribuir para a fundamentação científica de uma possível aplicação terapêutica deste fármaco em portadores de EM.

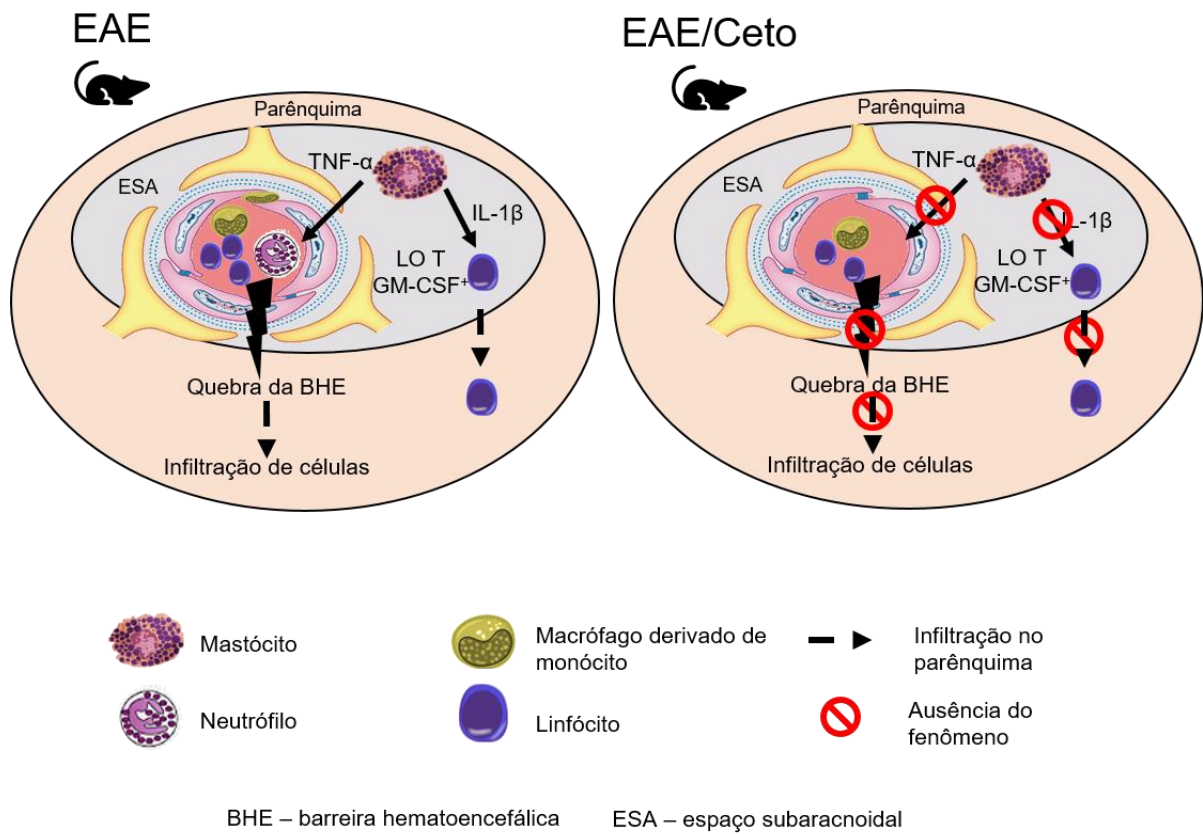


Figura 21. Possível mecanismo envolvido com o efeito protetor do cetotifeno no desenvolvimento da EAE. A manutenção da função da barreira hematoencefálica e consequente ausência de infiltrado inflamatório no sistema nervoso central determinada pelo tratamento com cetotifeno pode estar associada com a estabilização de mastócitos, impedindo a liberação de mediadores como TNF- α e IL-1 β , citocinas relacionadas com a quebra da barreira hematoencefálica e infiltração de linfócitos T autorreativos na EAE.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

O tratamento com fumarato de cetotifeno impede o desenvolvimento clínico da encefalomielite autoimune experimental por mecanismos que envolvem a manutenção da função da barreira hematoencefálica e consequente bloqueio da infiltração inflamatória no sistema nervoso central.

REFERÊNCIAS

- AMOR, S.; WOODROOFE, M. N. Innate and adaptive immune responses in neurodegeneration and repair. **Immunology**, v. 141, n. 3, p. 287-91, Mar 2014.
- ANGIARI, S. Selectin-mediated leukocyte trafficking during the development of autoimmune disease. **Autoimmun Rev**, v. 14, n. 11, p. 984-95, Nov 2015.
- ARANAMI, T.; YAMAMURA, T. Th17 Cells and autoimmune encephalomyelitis (EAE/MS). **Allergol Int**, v. 57, n. 2, p. 115-20, Jun 2008.
- ARGAW, A. T. et al. IL-1beta regulates blood-brain barrier permeability via reactivation of the hypoxia-angiogenesis program. **J Immunol**, v. 177, n. 8, p. 5574-84, Oct 15 2006.
- ASCHERIO, A. Environmental factors in multiple sclerosis. **Expert Rev Neurother**, v. 13, n. 12 Suppl, p. 3-9, Dec 2013.
- AXISA, P. P.; HAFLER, D. A. Multiple sclerosis: genetics, biomarkers, treatments. **Curr Opin Neurol**, v. 29, n. 3, p. 345-53, Jun 2016.
- BABA, A. et al. Anti-Allergic Drugs Tranilast and Ketotifen Dose-Dependently Exert Mast Cell-Stabilizing Properties. **Cell Physiol Biochem**, v. 38, n. 1, p. 15-27, 2016.
- BABBE, H. et al. Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. **J Exp Med**, v. 192, n. 3, p. 393-404, Aug 07 2000.
- BANKS, W. A. From blood-brain barrier to blood-brain interface: new opportunities for CNS drug delivery. **Nat Rev Drug Discov**, v. 15, n. 4, p. 275-92, Apr 2016.
- BARCLAY, W.; SHINOHARA, M. L. Inflammasome activation in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). **Brain Pathol**, v. 27, n. 2, p. 213-219, Mar 2017.
- BENNETT, J. L. et al. Bone marrow-derived mast cells accumulate in the central nervous system during inflammation but are dispensable for experimental autoimmune encephalomyelitis pathogenesis. **J Immunol**, v. 182, n. 9, p. 5507-14, May 01 2009.
- BENNETT, M. L. et al. New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 113, n. 12, p. E1738-46, Mar 22 2016.

BETTELLI, E. et al. Loss of T-bet, but not STAT1, prevents the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Exp Med**, v. 200, n. 1, p. 79-87, Jul 05 2004.

BILLIAU, A.; MATTHYS, P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. **J Leukoc Biol**, v. 70, n. 6, p. 849-60, Dec 2001.

BOGIE, J. F.; STINISSEN, P.; HENDRIKS, J. J. Macrophage subsets and microglia in multiple sclerosis. **Acta Neuropathol**, v. 128, n. 2, p. 191-213, Aug 2014.

BROWN, M. A.; HATFIELD, J. K. Mast Cells are Important Modifiers of Autoimmune Disease: With so Much Evidence, Why is There Still Controversy? **Front Immunol**, v. 3, p. 147, 2012.

BROWNE, P. et al. Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity. **Neurology**, v. 83, n. 11, p. 1022-4, Sep 09 2014.

CAVONE, L. et al. Dysregulation of sphingosine 1 phosphate receptor-1 (S1P1) signaling and regulatory lymphocyte-dependent immunosuppression in a model of post-fingolimod MS rebound. **Brain Behav Immun**, v. 50, p. 78-86, Nov 2015.

CHEN, G.; SHANNON, M. Transcription factors and th17 cell development in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Crit Rev Immunol**, v. 33, n. 2, p. 165-82, 2013.

CHEN, Z. et al. Role of Ketotifen on metabolic profiles, inflammation and oxidative stress in diabetic rats. **Endocr J**, Mar 17 2017.

CHENG, Y. et al. Diversity of immune cell types in multiple sclerosis and its animal model: Pathological and therapeutic implications. **J Neurosci Res**, Jan 13 2017.

CHIUSO-MINICUCCI, F. et al. Treatment with Vitamin D/MOG Association Suppresses Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **PLoS One**, v. 10, n. 5, p. e0125836, 2015.

CHRISTY, A. L.; BROWN, M. A. The multitasking mast cell: positive and negative roles in the progression of autoimmunity. **J Immunol**, v. 179, n. 5, p. 2673-9, Sep 01 2007.

CHRISTY, A. L. et al. Mast cell activation and neutrophil recruitment promotes early and robust inflammation in the meninges in EAE. **J Autoimmun**, v. 42, p. 50-61, May 2013.

COCLITU, C.; CONSTANTINESCU, C. S.; TANASESCU, R. The future of multiple sclerosis treatments. **Expert Rev Neurother**, v. 16, n. 12, p. 1341-1356, Dec 2016.

COLES, A. J. et al. The window of therapeutic opportunity in multiple sclerosis: evidence from monoclonal antibody therapy. **J Neurol**, v. 253, n. 1, p. 98-108, Jan 2006.

COMINI-FROTA, E. R. et al. Frequency of reported European ancestry among multiple sclerosis patients from four cities in the southern and southeastern regions of Brazil. **Clin Neurol Neurosurg**, v. 115, n. 9, p. 1642-6, Sep 2013.

CONTI, P.; KEMPURAJ, D. Important role of mast cells in multiple sclerosis. **Mult Scler Relat Disord**, v. 5, p. 77-80, Jan 2016.

COSTANZA, M.; COLOMBO, M. P.; PEDOTTI, R. Mast cells in the pathogenesis of multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. **Int J Mol Sci**, v. 13, n. 11, p. 15107-25, 2012.

CRAPS, L. P.; NEY, U. M. Ketotifen: current views on its mechanism of action and their therapeutic implications. **Respiration**, v. 45, n. 4, p. 411-21, 1984.

DAMAL, K.; STOKER, E.; FOLEY, J. F. Optimizing therapeutics in the management of patients with multiple sclerosis: a review of drug efficacy, dosing, and mechanisms of action. **Biologics**, v. 7, p. 247-58, 2013.

DAVIES, C. L.; MIRON, V. E. Distinct origins, gene expression and function of microglia and monocyte-derived macrophages in CNS myelin injury and regeneration. **Clin Immunol**, Jul 01 2016.

DE KOZAK, Y. et al. Pharmacological modulation of IgE-dependent mast cell degranulation in experimental autoimmune uveoretinitis. **Jpn J Ophthalmol**, v. 27, n. 4, p. 598-608, 1983.

DEJEAN, A. S. et al. Transcription factor Foxo3 controls the magnitude of T cell immune responses by modulating the function of dendritic cells. **Nat Immunol**, v. 10, n. 5, p. 504-13, May 2009.

DENDROU, C. A.; FUGGER, L.; FRIESE, M. A. Immunopathology of multiple sclerosis. **Nat Rev Immunol**, v. 15, n. 9, p. 545-58, Sep 15 2015.

DESHPANDE, P.; KING, I. L.; SEGAL, B. M. IL-12 driven upregulation of P-selectin ligand on myelin-specific T cells is a critical step in an animal model of autoimmune demyelination. **J Neuroimmunol**, v. 173, n. 1-2, p. 35-44, Apr 2006.

DEVONSHIRE, V. et al. Relapse and disability outcomes in patients with multiple sclerosis treated with fingolimod: subgroup analyses of the double-blind, randomised, placebo-controlled FREEDOMS study. **Lancet Neurol**, v. 11, n. 5, p. 420-8, May 2012.

DI FILIPPO, M. et al. Persistent activation of microglia and NADPH oxidase [corrected] drive hippocampal dysfunction in experimental multiple sclerosis. **Sci Rep**, v. 6, p. 20926, Feb 18 2016.

DIETSCH, G. N.; HINRICHS, D. J. The role of mast cells in the elicitation of experimental allergic encephalomyelitis. **J Immunol**, v. 142, n. 5, p. 1476-81, Mar 01 1989.

DIMITRIADOU, V.; PANG, X.; THEOHARIDES, T. C. Hydroxyzine inhibits experimental allergic encephalomyelitis (EAE) and associated brain mast cell activation. **Int J Immunopharmacol**, v. 22, n. 9, p. 673-84, Sep 2000.

DONG, H. et al. Suppression of Brain Mast Cells Degranulation Inhibits Microglial Activation and Central Nervous System Inflammation. **Mol Neurobiol**, v. 54, n. 2, p. 997-1007, Mar 2017.

DUDECK, J. et al. Mast-Cell-Derived TNF Amplifies CD8(+) Dendritic Cell Functionality and CD8(+) T Cell Priming. **Cell Rep**, v. 13, n. 2, p. 399-411, Oct 13 2015.

DUMAS, A. et al. The inflammasome pyrin contributes to pertussis toxin-induced IL-1beta synthesis, neutrophil intravascular crawling and autoimmune encephalomyelitis. **PLoS Pathog**, v. 10, n. 5, p. e1004150, May 2014.

EDWARDS, L. J. et al. Central inflammation versus peripheral regulation in multiple sclerosis. **J Neurol**, v. 258, n. 8, p. 1518-27, Aug 2011.

EL-HAGGAR, S. M.; FARRAG, W. F.; KOTKATA, F. A. Effect of ketotifen in obese patients with type 2 diabetes mellitus. **J Diabetes Complications**, v. 29, n. 3, p. 427-32, Apr 2015.

ELIEH-ALI-KOMI, D.; CAO, Y. Role of Mast Cells in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **Clin Rev Allergy Immunol**, Dec 26 2016.

FAUSTINO-ROCHA, A. I. et al. Mast Cells in Mammary Carcinogenesis: Host or Tumor Supporters? **Anticancer Res**, v. 37, n. 3, p. 1013-1021, Mar 2017.

FINN, D. F.; WALSH, J. J. Twenty-first century mast cell stabilizers. **Br J Pharmacol**, v. 170, n. 1, p. 23-37, Sep 2013.

FLETCHER, J. M. et al. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. **Clin Exp Immunol**, v. 162, n. 1, p. 1-11, Oct 2010.

FRISCHER, J. M. et al. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. **Brain**, v. 132, n. Pt 5, p. 1175-89, May 2009.

FURUZAWA-CARBALLEDA, J.; VARGAS-ROJAS, M. I.; CABRAL, A. R. Autoimmune inflammation from the Th17 perspective. **Autoimmun Rev**, v. 6, n. 3, p. 169-75, Jan 2007.

GALIMBERTI, D. et al. E-selectin A561C and G98T polymorphisms influence susceptibility and course of multiple sclerosis. **J Neuroimmunol**, v. 165, n. 1-2, p. 201-5, Aug 2005.

- GILDEN, D. H. Infectious causes of multiple sclerosis. **Lancet Neurol**, v. 4, n. 3, p. 195-202, Mar 2005.
- GLENN, J. D.; MOWRY, E. M. Emerging Concepts on the Gut Microbiome and Multiple Sclerosis. **J Interferon Cytokine Res**, v. 36, n. 6, p. 347-57, Jun 2016.
- GREGORY, G. D. et al. Mast cells are required for optimal autoreactive T cell responses in a murine model of multiple sclerosis. **Eur J Immunol**, v. 35, n. 12, p. 3478-86, Dec 2005.
- GRIGORIADIS, N.; VAN PESCH, V.; PARADIG, M. S. G. A basic overview of multiple sclerosis immunopathology. **Eur J Neurol**, v. 22 Suppl 2, p. 3-13, Oct 2015.
- HAAS, J. et al. Reduced suppressive effect of CD4+CD25high regulatory T cells on the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis. **Eur J Immunol**, v. 35, n. 11, p. 3343-52, Nov 2005.
- HERSHKO, A. Y.; RIVERA, J. Mast cell and T cell communication; amplification and control of adaptive immunity. **Immunol Lett**, v. 128, n. 2, p. 98-104, Feb 16 2010.
- HOHLFELD, R. 'Gimme five': future challenges in multiple sclerosis. ECTRIMS Lecture 2009. **Mult Scler**, v. 16, n. 1, p. 3-14, Jan 2010.
- HOHLFELD, R.; MEINL, E. Ocrelizumab in multiple sclerosis: markers and mechanisms. **Lancet Neurol**, v. 16, n. 4, p. 259-261, Apr 2017.
- HONG, G. U. et al. Anti-CD40 Ab- or 8-oxo-dG-enhanced Treg cells reduce development of experimental autoimmune encephalomyelitis via down-regulating migration and activation of mast cells. **J Neuroimmunol**, v. 260, n. 1-2, p. 60-73, Jul 15 2013.
- HONG, G. U. et al. IgE and IgA produced by OX40-OX40L or CD40-CD40L interaction in B cells-mast cells re-activate FcepsilonRI or FcalphaRI on mast cells in mouse allergic asthma. **Eur J Pharmacol**, v. 754, p. 199-210, May 5 2015.
- HSU, D. Z. et al. Mast Cell Stabilizer Ketotifen Inhibits Gouty Inflammation in Rats. **Am J Ther**, v. 23, n. 4, p. e1009-15, Jul-Aug 2016.
- HUAN, J. et al. Decreased FOXP3 levels in multiple sclerosis patients. **J Neurosci Res**, v. 81, n. 1, p. 45-52, Jul 1 2005.
- HUI, K. K.; YU, J. L. Ketotifen increases cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in intact human lymphocyte and potentiates other adenylate cyclase activating agents. **Life Sci**, v. 40, n. 13, p. 1259-65, Mar 30 1987.

HUNG, C. H. et al. Suppressive effects of ketotifen on Th1- and Th2-related chemokines of monocytes. **Pediatr Allergy Immunol**, v. 18, n. 5, p. 378-84, Aug 2007.

HUPPERT, J. et al. Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. **FASEB J**, v. 24, n. 4, p. 1023-34, Apr 2010.

KABRA, S. K. et al. Ketotifen for asthma in children aged 5 to 15 years: a randomized placebo-controlled trial. **Ann Allergy Asthma Immunol**, v. 85, n. 1, p. 46-52, Jul 2000.

KAPPOS, L. et al. Oral fingolimod (FTY720) for relapsing multiple sclerosis. **N Engl J Med**, v. 355, n. 11, p. 1124-40, Sep 14 2006.

KARAAVVAZ, M. et al. Levothyroxine versus ketotifen in the treatment of patients with chronic urticaria and thyroid autoimmunity. **J Dermatolog Treat**, v. 13, n. 4, p. 165-72, Dec 2002.

KARAGKOUNI, A.; ALEVIZOS, M.; THEOHARIDES, T. C. Effect of stress on brain inflammation and multiple sclerosis. **Autoimmun Rev**, v. 12, n. 10, p. 947-53, Aug 2013.

KAWAKAMI, N. et al. An autoimmunity odyssey: how autoreactive T cells infiltrate into the CNS. **Immunol Rev**, v. 248, n. 1, p. 140-55, Jul 2012.

KAWANO, Y. et al. Ketotifen inhibits allergen-specific T lymphocytes' responses by suppressing antigen presentation with concomitant decrease of HLA-DQ antigen on macrophages. **Asian Pac J Allergy Immunol**, v. 14, n. 2, p. 69-79, Dec 1996.

KEIR, M. E.; FRANCISCO, L. M.; SHARPE, A. H. PD-1 and its ligands in T-cell immunity. **Curr Opin Immunol**, v. 19, n. 3, p. 309-14, Jun 2007.

KIM, H. J. et al. Novel Suppressive Effects of Ketotifen on Migration and Invasion of MDA-MB-231 and HT-1080 Cancer Cells. **Biomol Ther (Seoul)**, v. 22, n. 6, p. 540-6, Nov 2014.

KIM, M. S. et al. Mast cell stabilizer, ketotifen, prevents UV-induced wrinkle formation. **J Invest Dermatol**, v. 133, n. 4, p. 1104-7, Apr 2013.

KLINKERT, W. E. et al. TNF-alpha receptor fusion protein prevents experimental auto-immune encephalomyelitis and demyelination in Lewis rats: an overview. **J Neuroimmunol**, v. 72, n. 2, p. 163-8, Feb 1997.

KNOX, C. et al. DrugBank 3.0: a comprehensive resource for 'omics' research on drugs. **Nucleic Acids Res**, v. 39, n. Database issue, p. D1035-41, Jan 2011.

KOMIYAMA, Y. et al. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Immunol**, v. 177, n. 1, p. 566-73, Jul 1 2006.

KONDO, N. et al. Suppression of proliferative responses of lymphocytes to food antigens by an anti-allergic drug, ketotifen fumarate, in patients with food-sensitive atopic dermatitis. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 103, n. 3, p. 234-8, 1994.

KOZOVSKA, M. E. et al. Interferon beta induces T-helper 2 immune deviation in MS. **Neurology**, v. 53, n. 8, p. 1692-7, Nov 10 1999.

LAI, D. S. et al. The comparison of the efficacy and safety of cetirizine, oxatomide, ketotifen, and a placebo for the treatment of childhood perennial allergic rhinitis. **Ann Allergy Asthma Immunol**, v. 89, n. 6, p. 589-98, Dec 2002.

LAMBIASE, A.; MICERA, A.; BONINI, S. Multiple action agents and the eye: do they really stabilize mast cells? **Curr Opin Allergy Clin Immunol**, v. 9, n. 5, p. 454-65, Oct 2009.

LAROCHELLE, C.; ALVAREZ, J. I.; PRAT, A. How do immune cells overcome the blood-brain barrier in multiple sclerosis? **FEBS Lett**, v. 585, n. 23, p. 3770-80, Dec 01 2011.

LASSMANN, H.; BRADL, M. Multiple sclerosis: experimental models and reality. **Acta Neuropathol**, v. 133, n. 2, p. 223-244, Feb 2017.

LEGROUX, L.; ARBOUR, N. Multiple Sclerosis and T Lymphocytes: An Entangled Story. **J Neuroimmune Pharmacol**, v. 10, n. 4, p. 528-46, Dec 2015.

LINTHICUM, D. S.; MUNOZ, J. J.; BLASKETT, A. Acute experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. I. Adjuvant action of Bordetella pertussis is due to vasoactive amine sensitization and increased vascular permeability of the central nervous system. **Cell Immunol**, v. 73, n. 2, p. 299-310, Nov 01 1982.

LOPES PINHEIRO, M. A. et al. Immune cell trafficking across the barriers of the central nervous system in multiple sclerosis and stroke. **Biochim Biophys Acta**, v. 1862, n. 3, p. 461-71, Mar 2016.

LOSSIUS, A. et al. Epstein-Barr virus in systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and multiple sclerosis-association and causation. **Viruses**, v. 4, n. 12, p. 3701-30, Dec 2012.

LOVETT-RACKE, A. E.; YANG, Y.; RACKE, M. K. Th1 versus Th17: are T cell cytokines relevant in multiple sclerosis? **Biochim Biophys Acta**, v. 1812, n. 2, p. 246-51, Feb 2011.

LV, S. et al. Tumour necrosis factor-alpha affects blood-brain barrier permeability and tight junction-associated occludin in acute liver failure. **Liver Int**, v. 30, n. 8, p. 1198-210, Sep 2010.

MARRIE, R. A. Environmental risk factors in multiple sclerosis aetiology. **Lancet Neurol**, v. 3, n. 12, p. 709-18, Dec 2004.

MARTIN, R. Neutralisation of IL12 p40 or IL23 p40 does not block inflammation in multiple sclerosis. **Lancet Neurol**, v. 7, n. 9, p. 765-6, Sep 2008.

MCKITTRICK, C. M.; LAWRENCE, C. E.; CARSWELL, H. V. Mast cells promote blood brain barrier breakdown and neutrophil infiltration in a mouse model of focal cerebral ischemia. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 35, n. 4, p. 638-47, Mar 31 2015.

MILO, R.; KAHANA, E. Multiple sclerosis: geoeidemiology, genetics and the environment. **Autoimmun Rev**, v. 9, n. 5, p. A387-94, Mar 2010.

MONUMENT, M. J. et al. Neuroinflammatory Mechanisms of Connective Tissue Fibrosis: Targeting Neurogenic and Mast Cell Contributions. **Adv Wound Care (New Rochelle)**, v. 4, n. 3, p. 137-151, Mar 01 2015.

MOON, T. C. et al. Advances in mast cell biology: new understanding of heterogeneity and function. **Mucosal Immunol**, v. 3, n. 2, p. 111-28, Mar 2010.

MURPHY, A. C. et al. Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Brain Behav Immun**, v. 24, n. 4, p. 641-51, May 2010.

NELISSEN, S. et al. The role of mast cells in neuroinflammation. **Acta Neuropathol**, v. 125, n. 5, p. 637-50, May 2013.

NORI, M. et al. Ebastine inhibits T cell migration, production of Th2-type cytokines and proinflammatory cytokines. **Clin Exp Allergy**, v. 33, n. 11, p. 1544-54, Nov 2003.

PAN, W.; KASTIN, A. J. Tumor necrosis factor and stroke: role of the blood-brain barrier. **Prog Neurobiol**, v. 83, n. 6, p. 363-74, Dec 2007.

PLUDOWSKI, P. et al. Vitamin D effects on musculoskeletal health, immunity, autoimmunity, cardiovascular disease, cancer, fertility, pregnancy, dementia and mortality-a review of recent evidence. **Autoimmun Rev**, v. 12, n. 10, p. 976-89, Aug 2013.

POTHOULAKIS, C. et al. Ketotifen inhibits Clostridium difficile toxin A-induced enteritis in rat ileum. **Gastroenterology**, v. 105, n. 3, p. 701-7, Sep 1993.

PROCACCINI, C. et al. Animal models of Multiple Sclerosis. **Eur J Pharmacol**, v. 759, p. 182-91, Jul 15 2015.

RAO, R. M. et al. The S128R polymorphism of E-selectin mediates neuraminidase-resistant tethering of myeloid cells under shear flow. **Eur J Immunol**, v. 32, n. 1, p. 251-60, Jan 2002.

RAWJI, K. S.; YONG, V. W. The benefits and detriments of macrophages/microglia in models of multiple sclerosis. **Clin Dev Immunol**, v. 2013, p. 948976, 2013.

RODRIGUES, S. F.; GRANGER, D. N. Blood cells and endothelial barrier function. **Tissue Barriers**, v. 3, n. 1-2, p. e978720, 2015.

RONCHI, F. et al. Experimental priming of encephalitogenic Th1/Th17 cells requires pertussis toxin-driven IL-1beta production by myeloid cells. **Nat Commun**, v. 7, p. 11541, May 18 2016.

ROSTAMI, A.; CIRIC, B. Role of Th17 cells in the pathogenesis of CNS inflammatory demyelination. **J Neurol Sci**, v. 333, n. 1-2, p. 76-87, Oct 15 2013.

ROTHHAMMER, V.; QUINTANA, F. J. Environmental control of autoimmune inflammation in the central nervous system. **Curr Opin Immunol**, v. 43, p. 46-53, Dec 2016.

ROY, M. et al. CXCL1 can be regulated by IL-6 and promotes granulocyte adhesion to brain capillaries during bacterial toxin exposure and encephalomyelitis. **J Neuroinflammation**, v. 9, p. 18, Jan 23 2012.

RUSSI, A. E.; BROWN, M. A. The meninges: new therapeutic targets for multiple sclerosis. **Transl Res**, v. 165, n. 2, p. 255-69, Feb 2015.

RUSSI, A. E.; WALKER-CAULFIELD, M. E.; BROWN, M. A. Mast cell inflammasome activity in the meninges regulates EAE disease severity. **Clin Immunol**, Apr 21 2016.

RUSSI, A. E. et al. Meningeal mast cell-T cell crosstalk regulates T cell encephalitogenicity. **J Autoimmun**, v. 73, p. 100-10, Sep 2016.

SALIGRAMA, N. et al. Systemic lack of canonical histamine receptor signaling results in increased resistance to autoimmune encephalomyelitis. **J Immunol**, v. 191, n. 2, p. 614-22, Jul 15 2013.

SALOU, M. et al. Expanded CD8 T-cell sharing between periphery and CNS in multiple sclerosis. **Ann Clin Transl Neurol**, v. 2, n. 6, p. 609-22, Jun 2015.

SALOU, M. et al. Involvement of CD8(+) T Cells in Multiple Sclerosis. **Front Immunol**, v. 6, p. 604, 2015.

SATHIYANADAN, K. et al. PSGL-1 and E/P-selectins are essential for T-cell rolling in inflamed CNS microvessels but dispensable for initiation of EAE. **Eur J Immunol**, v. 44, n. 8, p. 2287-94, Aug 2014.

SAYED, B. A.; BROWN, M. A. Mast cells as modulators of T-cell responses. **Immunol Rev**, v. 217, p. 53-64, Jun 2007.

SCHENK, G. J.; DE VRIES, H. E. Altered blood-brain barrier transport in neuro-inflammatory disorders. **Drug Discov Today Technol**, v. 20, p. 5-11, Jun 2016.

SEGAL, B. M. et al. Repeated subcutaneous injections of IL12/23 p40 neutralising antibody, ustekinumab, in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase II, double-blind, placebo-controlled, randomised, dose-ranging study. **Lancet Neurol**, v. 7, n. 9, p. 796-804, Sep 2008.

SELMI, C. Autoimmunity in 2012. **Clin Rev Allergy Immunol**, v. 45, n. 2, p. 290-301, Oct 2013.

SILVER, R.; CURLEY, J. P. Mast cells on the mind: new insights and opportunities. **Trends Neurosci**, v. 36, n. 9, p. 513-21, Sep 2013.

SINHA, S. et al. CD8(+) T-Cells as Immune Regulators of Multiple Sclerosis. **Front Immunol**, v. 6, p. 619, 2015.

SKAPER, S. D.; FACCI, L.; GIUSTI, P. Glia and mast cells as targets for palmitoylethanolamide, an anti-inflammatory and neuroprotective lipid mediator. **Mol Neurobiol**, v. 48, n. 2, p. 340-52, Oct 2013.

SNYMAN, J. R. et al. Effect of cetirizine, ketotifen and chlorpheniramine on the dynamics of the cutaneous hypersensitivity reaction: a comparative study. **Eur J Clin Pharmacol**, v. 42, n. 4, p. 359-62, 1992.

SOELLNER, I. A. et al. Differential aspects of immune cell infiltration and neurodegeneration in acute and relapse experimental autoimmune encephalomyelitis. **Clin Immunol**, v. 149, n. 3, p. 519-29, Dec 2013.

SOSPEDRA, M.; MARTIN, R. Immunology of multiple sclerosis. **Annu Rev Immunol**, v. 23, p. 683-747, 2005.

STUVE, O. et al. Pharmacological treatment of early multiple sclerosis. **Drugs**, v. 68, n. 1, p. 73-83, 2008.

SUURMOND, J. et al. Expansion of Th17 Cells by Human Mast Cells Is Driven by Inflammasome-Independent IL-1beta. **J Immunol**, v. 197, n. 11, p. 4473-4481, Dec 01 2016.

TANG, Q. et al. Distinct roles of CTLA-4 and TGF-beta in CD4+CD25+ regulatory T cell function. **Eur J Immunol**, v. 34, n. 11, p. 2996-3005, Nov 2004.

TAYLOR, M. L.; METCALFE, D. D. Mast cells in allergy and host defense. **Allergy Asthma Proc**, v. 22, n. 3, p. 115-9, May-Jun 2001.

TREMLET, H. et al. The gut microbiome in human neurological disease: A review. **Ann Neurol**, v. 81, n. 3, p. 369-382, Mar 2017.

TZARTOS, J. S. et al. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. **Am J Pathol**, v. 172, n. 1, p. 146-55, Jan 2008.

VARATHARAJ, A.; GALEA, I. The blood-brain barrier in systemic inflammation. **Brain Behav Immun**, v. 60, p. 1-12, Feb 2017.

VASCONCELOS, C. C. et al. Multiple sclerosis in Brazil: A systematic review. **Clin Neurol Neurosurg**, v. 151, p. 24-30, Dec 2016.

VENKEN, K. et al. Natural naive CD4+CD25+CD127low regulatory T cell (Treg) development and function are disturbed in multiple sclerosis patients: recovery of memory Treg homeostasis during disease progression. **J Immunol**, v. 180, n. 9, p. 6411-20, May 01 2008.

WADE, L.; BIELORY, L.; RUDNER, S. Ophthalmic antihistamines and H1-H4 receptors. **Curr Opin Allergy Clin Immunol**, v. 12, n. 5, p. 510-6, Oct 2012.

WALKER-CAULFIELD, M. E.; HATFIELD, J. K.; BROWN, M. A. Dynamic changes in meningeal inflammation correspond to clinical exacerbations in a murine model of relapsing-remitting multiple sclerosis. **J Neuroimmunol**, v. 278, p. 112-22, Jan 15 2015.

WALKER, M. E.; HATFIELD, J. K.; BROWN, M. A. New insights into the role of mast cells in autoimmunity: evidence for a common mechanism of action? **Biochim Biophys Acta**, v. 1822, n. 1, p. 57-65, Jan 2012.

WANG, Z. et al. Immunoglobulin E and mast cell proteases are potential risk factors of human pre-diabetes and diabetes mellitus. **PLoS One**, v. 6, n. 12, p. e28962, 2011.

WEKERLE, H. The gut-brain connection: triggering of brain autoimmune disease by commensal gut bacteria. **Rheumatology (Oxford)**, v. 55, n. suppl 2, p. ii68-ii75, Dec 2016.

WERNERSSON, S.; PEJLER, G. Mast cell secretory granules: armed for battle. **Nat Rev Immunol**, v. 14, n. 7, p. 478-94, Jul 2014.

WILHELM, M.; SILVER, R.; SILVERMAN, A. J. Central nervous system neurons acquire mast cell products via transgranulation. **Eur J Neurosci**, v. 22, n. 9, p. 2238-48, Nov 2005.

WILSON, E. H.; WENINGER, W.; HUNTER, C. A. Trafficking of immune cells in the central nervous system. **J Clin Invest**, v. 120, n. 5, p. 1368-79, May 2010.

WING, K. et al. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. **Science**, v. 322, n. 5899, p. 271-5, Oct 10 2008.

WOJKOWSKA, D. W. et al. Interactions between neutrophils, Th17 cells, and chemokines during the initiation of experimental model of multiple sclerosis. **Mediators Inflamm**, v. 2014, p. 590409, 2014.

WORBS, T.; HAMMERSCHMIDT, S. I.; FORSTER, R. Dendritic cell migration in health and disease. **Nat Rev Immunol**, v. 17, n. 1, p. 30-48, Jan 2017.

YANG, C. Y. et al. The implication of vitamin D and autoimmunity: a comprehensive review. **Clin Rev Allergy Immunol**, v. 45, n. 2, p. 217-26, Oct 2013.

YU, X.; KASPRICK, A.; PETERSEN, F. Revisiting the role of mast cells in autoimmunity. **Autoimmun Rev**, v. 14, n. 9, p. 751-9, Sep 2015.

ZHANG, X. et al. Induction of Microglial Activation by Mediators Released from Mast Cells. **Cell Physiol Biochem**, v. 38, n. 4, p. 1520-31, 2016.

ANEXO A - aprovação do CEUA para o desenvolvimento da pesquisa.

 **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu




Certificado

Certificamos que o Protocolo nº **638-CEUA**, sobre “Envolvimento dos mastócitos no efeito protetor da vitamina D sobre a encefalomielite autoimune experimental”, sob a responsabilidade de **Alexandrina Sartori**, está de acordo com a legislação vigente (Lei 11.794/2008 e Decreto 6.899/2009), com as resoluções normativas aplicáveis à luz dos Princípios Éticos na Experimentação Animal elaborados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA), e foi aprovado “*Ad referendum*” da **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)**, nesta data.

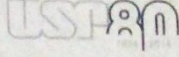
Botucatu, 28 de agosto de 2014.


Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano
Presidente da CEUA

Instituto de Biociências - Diretoria Técnica Acadêmica
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-970 Botucatu SP Brasil
Tel 14 3880 0851 fax 14 3815 3744 e-mail: sedta@ibb.unesp.br

ANEXO B. Aprovação do CEEPA para o desenvolvimento da pesquisa

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru



Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

CEEPA-Proc. Nº 019/2014

Bauru, 6 de outubro de 2014.


Senhora Professora,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **Envolvimento dos mastócitos no efeito protetor da vitamina D sobre a encefalomielite autoimune experimental**, de autoria de Karen Henriette Pinke, sob sua orientação e coorientação da Profª Drª Vanessa Soares Lara, foi enviado ao relator para avaliação e considerado **APROVADO** em reunião desta Comissão, realizada no dia **3 de outubro de 2014**.

Informamos que qualquer alteração na pesquisa, seja comunicada com antecedência a esta Comissão para análise ética.

Solicitamos que ao final da pesquisa seja enviado, para avaliação desta Comissão, um Relatório com os resultados obtidos para análise ética e emissão de parecer final, o qual poderá ser utilizado para fins de publicação científica.

Atenciosamente,



Profª Drª Ana Paula Campanelli
Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Profª Drª Alexandrina Sartori
Docente do Departamento de Microbiologia e Imunologia (Unesp-Botucatu)

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
e-mail: mferrari@fob.usp.br – Fone/FAX (0xx14) 3235-8356
<http://www.fob.usp.br>