



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA

Patrícia Aparecida Borim

**“Efeito da rapamicina em células de animais com
encefalomielite autoimune experimental”**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais (AC.: Imunologia Celular).

Orientadora: Profa. Dra. Alexandrina Sartori

Coorientadora: Profa. Dra. Thais Fernanda de Campos Fraga da Silva

Botucatu-2019

Patrícia Aparecida Borim

**Efeito da rapamicina em células de animais com
encefalomielite autoimune experimental**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Mestre em Doenças
Tropicais (AC.: Imunologia Celular).

Orientadora: Profa. Dra. Alexandrina Sartori

Coorientadora: Profa. Dra. Thais Fernanda de Campos Fraga da Silva

Botucatu-2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Borim, Patrícia Aparecida.

Efeito da rapamicina em células de animais com
encefalomielite autoimune experimental / Patrícia
Aparecida Borim. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de
Botucatu

Orientador: Alexandrina Sartori

Coorientador: Thaís Fernanda de Campos Fraga da Silva

Capes: 40101096

1. Fatores imunológicos. 2. Esclerose múltipla. 3.
Linfócitos. 4. Microglia.

Palavras-chave: Imunomodulador; Esclerose múltipla;
Linfócitos; Microglia; mTOR.



Dedicatória



Aos meus pais, Odemar Luiz Borim e Margarida Messias Borim, pessoas importantes da minha vida, dedico esse trabalho com todo meu amor e carinho, agradeço imensamente por terem me proporcionado uma estrutura emocional sólida que permitiu meu progresso moral e intelectual. Todas as minhas boas atitudes eu devo a vocês e é por esses e inúmeros outros motivos que sempre os respeitarei e amarei.



Epígrafe



***“A verdadeira viagem de descobrimento
não consiste em procurar novas paisagens,
mas em ter novos olhos”
(Marcel Proust)***



Agradecimientos



Agradecimentos



À minha orientadora Prof^a. Dra. Alexandrina Sartori, pela confiança depositada em mim, por sua dedicação e pelos ensinamentos. Tenho muito orgulho de ter sido orientada por uma profissional extremamente comprometida a ensinar.

À minha coorientadora Prof^a Dra. Thais Fernanda de Campos Fraga da Silva, Deus é tão maravilhoso, ele faz tantas obras na nossa vida, que eu só tenho a agradecer a você. Muito obrigada pela paciência em todas as etapas desse projeto. Foi um grande prazer poder trabalhar com uma profissional que eu respeito e admiro. Obrigada por confiar sempre no meu potencial, na prática e no dia-a-dia, e principalmente pela amizade, carinho e por torcer tanto por mim.

Às minhas amigas do laboratório; Larissa Ragozo, Larissa Ishikawa, Luiza Mimura, Sofia Zorzella Pezavento, Juliana Toledo e Natalia Munhos. Serei eternamente grata por tudo que me foi proporcionado. Agradeço todo o apoio, conversas e risadas durante esse período. Obrigada por estarem sempre dispostas a me ajudar e sanar minhas dúvidas. Nessa nova jornada que se inicia vou levar um pouquinho de cada uma de vocês no meu coração.

À banca do Exame Geral de Qualificação, Prof. Dr. Robson Francisco Carvalho e a Prof^a. Dra. Graziela Gorete Romagnoli Castilho que cederam parte de seu precioso tempo para contribuir com meu trabalho.

Aos membros da banca de Defesa, Prof. Dr. Alessandro dos Santos Farias e Prof^ª. Dra. Graziela Gorete Romagnoli Castilho, por aceitarem meu convite e por compartilharem comigo este momento tão importante e esperado.

À minha amiga Dra Mariana Gatto que me proporcionou a base necessária para chegar até aqui. Obrigada por sempre ter acreditado e depositado sua confiança em mim ao longo desse tempo que se iniciou ainda no aprimoramento.

À minha amiga de moradia e de pós-graduação, Beatriz Soares Pereira, por todo o companheirismo e apoio. Sempre juntas nesse árduo caminho da pós graduação, te agradeço por compartilharmos momentos de desespero, mas na maioria das vezes, momentos de alegria e divertimento. Você entrou na minha vida de uma forma especial, me trazendo alegria e me mostrando que uma verdadeira amizade existe, nossa amizade é de Deus.

Aos meus avós Laurentina dos Santos e Nelson Lopes e Minha tia Lázara dos Santos (in memorian), pessoas que estarão eternamente no meu coração. Espero que onde estiverem estejam orgulhosos de mim.

Deus!

Agradeço a ti por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades. Obrigada, por me dares muito mais do que eu preciso e por me abençoar muito mais do que eu mereço.

Meus sinceros agradecimentos às seguintes instituições



À Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – FMB /UNESP;

Ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais e à Seção Técnica de Pós-Graduação da FMB, em especial à Bruna Quirino Jorgetto.

Ao Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – IBB/UNESP;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela concessão da bolsa durante o período de realização do mestrado;

À Fapesp pelo auxílio financeiro nº 2013/26257-8.



Resumo



BORIM, P. A. **Efeito da rapamicina em células de animais com encefalomielite autoimune experimental**. 2019. 62 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, 2019.

A rapamicina, também conhecida como sirolimus, é um imunossupressor isolado da bactéria *Streptomyces hygroscopicus*. Este fármaco tem sido empregado clinicamente para o controle de rejeição de transplantes de órgãos sólidos, diabetes, esclerose tuberosa, doenças neurodegenerativas e inclusive, no controle da esclerose múltipla (EM). O entendimento do mecanismo de ação da rapamicina requer o conhecimento da via de sinalização intracelular envolvendo os complexos mTOR (*mammalian target of rapamycin*). Evidências indicam que o mTOR está envolvido na ativação pró-inflamatória de leucócitos. Nesse contexto, o objetivo geral desta dissertação foi investigar o efeito in vitro da rapamicina em células envolvidas na imunopatogênese da encefalomielite autoimune experimental (EAE), um modelo murino de EM. Células do sistema nervoso central (SNC) e do baço de camundongos com EAE foram tratadas com rapamicina e simultaneamente estimuladas com glicoproteína da mielina de oligodendrócitos. A rapamicina reduziu a produção de IL-17 em culturas de células do SNC e do baço. Adicionalmente, diminuiu a produção de IFN- γ , TNF- α e IL-10 e a expressão gênica de RORc em culturas de células do SNC. A microglia, que é uma célula fagocítica residente no SNC e envolvida na neuroinflamação, também foi testada. Em células da microglia (linhagem BV-2) estimuladas com LPS, a rapamicina diminuiu a produção de TNF- α e IL-6 e também reduziu a mediana da intensidade da fluorescência referente às moléculas MHC II, CD40 e CD86. Este efeito imunossupressor foi associado à maior expressão gênica de TREM2 e menor expressão gênica de iNOS. Estes resultados indicaram que a rapamicina modula negativamente a ativação de células autorreativas e da microglia ativada. Portanto, propomos que outras moléculas candidatas à terapia da EM sejam inicialmente rastreadas usando essa abordagem.

Palavras-chave: imunomodulador, esclerose múltipla, linfócitos, microglia, mTOR.



Abstract



BORIM, P. A. **Effect of rapamycin on cells from mice with experimental autoimmune encephalomyelitis.** 2019. 62 p. Master thesis (Master) – Botucatu Medical School, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, 2019.

Rapamycin, also known as sirolimus, is an immunosuppressant produced by the bacterium *Streptomyces hygroscopicus*. Rapamycin has been clinically used for the control of rejection of solid organ transplants, diabetes, tuberous sclerosis, neurodegenerative diseases, including multiple sclerosis (MS). To better understand the mechanism of action of rapamycin, is necessary the knowledge of intracellular signaling of the mTOR (mammalian target of rapamycin) complex. Evidence indicates that mTOR is involved in the proinflammatory activation of leukocytes. In this scenario, the main objective of this investigation was to evaluate the in vitro effect of rapamycin in cells derived from mice with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) and in a microglia cell line. CNS and spleen cells from EAE mice were treated with rapamycin and simultaneously stimulated with a myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide. Rapamycin reduced IL-17 production in both, CNS and spleen cell cultures. Additionally, rapamycin decreased IFN- γ , TNF- α and IL-10 production and RORc mRNA expression in CNS cell cultures. Microglia, that is a phagocytic immune cell in the CNS involved in neuroinflammation, was also tested. Microglia (BV-2 lineage) treated simultaneously with rapamycin and LPS showed a decreased production of TNF- α and IL-6 and also reduced expression of MHC II, CD40 and CD86. This downmodulatory effect was associated to upregulated TREM2 mRNA and downregulated iNOS mRNA expression. These results indicated that rapamycin downmodulates the activation of autoreactive cells and activated microglia. We therefore propose that other MS therapy candidate molecules are initially screened by using this approach.

Key words: immunomodulation, multiple sclerosis, lymphocytes, microglia, mTOR.



Sumário



Sumário

Resumo

Abstract

Introdução	18
<i>Rapamicina</i>	<i>18</i>
<i>Esclerose múltipla e encefalomielite autoimune experimental</i>	<i>22</i>
<i>Aspectos terapêuticos na EM</i>	<i>24</i>
<i>Microglia: participação na imunopatogênese e alvo terapêutico da rapamicina</i>	<i>26</i>
Justificativa	29
Objetivos	30
Protocolos experimentais	31
Métodos	33
<i>Animais</i>	<i>33</i>
<i>Indução de EAE e avaliação clínica</i>	<i>33</i>
<i>Análise histopatológica</i>	<i>33</i>
<i>Cultura de células esplênicas</i>	<i>34</i>
<i>Cultura de células do SNC</i>	<i>34</i>
<i>Cultura de linhagem celular BV-2</i>	<i>35</i>
<i>Quantificação de citocinas por ELISA</i>	<i>35</i>
<i>Quantificação de citocinas por CBA</i>	<i>35</i>
<i>Extração de RNA</i>	<i>36</i>
<i>Ensaio de RT-qPCR</i>	<i>36</i>
<i>Atividade celular</i>	<i>37</i>
<i>Imunofenotipagem celular por citometria de fluxo</i>	<i>38</i>
<i>Análise estatística</i>	<i>38</i>
Resultados	39
<i>Características clínicas e histopatológicas dos animais com EAE</i>	<i>39</i>
<i>A rapamicina reduz a produção de IL-17 por células esplênicas de animais com EAE</i>	<i>40</i>
<i>A rapamicina diminui a produção de citocinas encefalitogênicas</i>	<i>40</i>
<i>A rapamicina induz um perfil M2 em células da microglia</i>	<i>43</i>
Discussão	46
Considerações finais	51
Referências	52

ANEXO

Anexo I – Certificado CEUA N° 1118	62
---	-----------



Capítulo 1



Introdução

1. Rapamicina

A rapamicina, também conhecida como sirolimus, é uma lactona macrocíclica isolada da bactéria *Streptomyces hygroscopicus*. Como esta bactéria foi isolada de uma amostra de solo obtida na Ilha de Rapa Nui (Ilha de Páscoa), esta lactona recebeu a denominação de rapamicina. Inicialmente a rapamicina foi identificada como um antibiótico/antifúngico (VÉZINA; KUDELSKI; SEHGAL, 1975). Desde sua aprovação pela US Food and Drug Administration (FDA), em 1999, suas propriedades têm sido melhor caracterizadas e seu emprego clínico foi ampliado incluindo o controle de rejeição de transplantes de órgãos sólidos (SAUNDERS; METCALFE; NICHOLSON, 2001) diabetes, esclerose tuberosa, doenças neurodegenerativas e também do processo de envelhecimento (LI; KIM; BLENIS, 2014). Na década de 80, cientistas descobriram que este fármaco também inibia o crescimento de tumores e desde 2007 dois derivados, Temsirolimus da Pfizer e Everolimus da Novartis, foram aprovados para uso em vários tipos de câncer, sendo administrados isoladamente ou em combinação com outros fármacos (DAI et al., 2012).

Como já mencionado, a rapamicina tem sido empregada para impedir rejeição de transplantes de órgãos sólidos, principalmente de rim. Entretanto esse medicamento pode desencadear efeitos colaterais em 10% dos pacientes e esses efeitos incluem: infecções, febre, cicatrização lenta, níveis baixos de diferentes células sanguíneas, níveis baixos de potássio e fosfato, níveis elevados de gorduras, colesterol, glicose e marcadores de degradação dos tecidos e de função hepática e renal, linfocite, dor em diversas partes do corpo, taquicardia, pressão arterial elevada, problemas intestinais, proteinúria, distúrbios menstruais, erupção cutânea e até acne (CHMP, 2018). Entretanto a agência europeia de medicamentos concluiu que os benefícios da rapamicina são superiores aos seus riscos e que o medicamento pode ser utilizado de forma segura e eficaz quando sob prescrição médica.

Nosso interesse neste fármaco reside nas suas propriedades imunossupressoras e no seu potencial de prevenção e tratamento de doenças neurodegenerativas, em especial no contexto da esclerose múltipla (EM). O entendimento do mecanismo de ação da rapamicina requer o conhecimento da via de sinalização intracelular envolvendo os complexos mTOR (*mammalian target of rapamycin*). Estes dois complexos são conhecidos como mTORC1 e mTORC2 e ambos estão envolvidos em processos fundamentais em diversas funções

celulares (SAXTON; SABATINI, 2017). A estrutura básica destes complexos é a mesma e inclui três moléculas: mTOR, DEPTOR e mLST8. No caso do mTORC1 estas moléculas estão associadas com mais duas moléculas, RAPTOR e PRAS40, e no caso do mTORC2 estão associadas a três moléculas adicionais, RICTOR, mSin1 e PROTOR (YIP et al., 2010). TOR é uma serina treonina quinase de elevado peso molecular (~290 KDa) que pertence à família das fosfatidilinositol quinases. Os sinais que ativam essas vias bem como as respectivas funções celulares afetadas estão esquematizados na figura A.

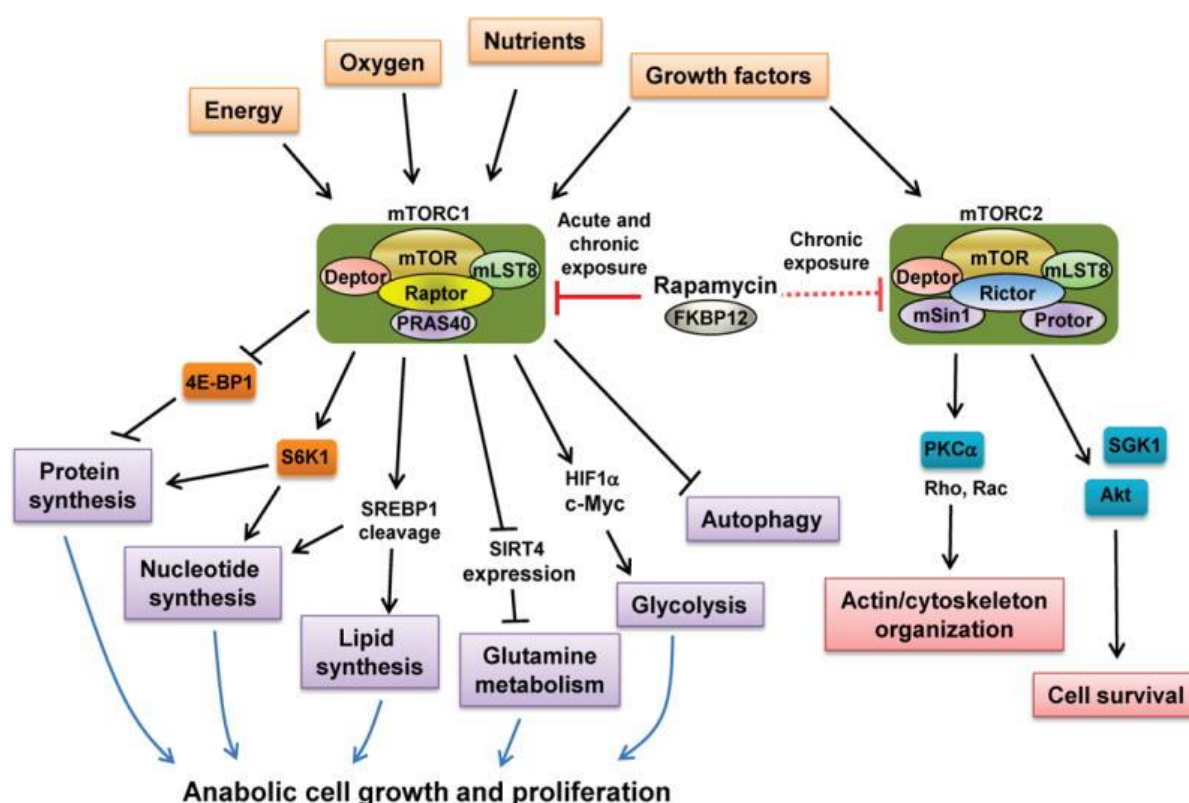


Figura A. Estrutura e funções do mTOR. mTOR existe em dois complexos funcionalmente distintos denominados mTORC1 e mTORC2. Exposição aguda ou crônica à rapamicina determina inibição de mTORC1 e mTORC2, respectivamente. Figura retirada de (LI; KIM; BLENIS, 2014).

Como mostrado na figura A estes complexos regulam respostas celulares distintas. O complexo mTORC1 integra vários sinais oriundos de fatores de crescimento, oxigênio, nível energético e nutrientes (aminoácidos por exemplo) para promover o crescimento celular e proliferação. A ativação desta via promove processos anabólicos tais como síntese de proteínas, lipídios e nucleotídeos, estimulação de vias de metabolismo energético (glicólise e glutaminólise) e inibição de processos catabólicos como por exemplo, autofagia (TEE, 2018).

De forma distinta do mTORC1, o mTORC2 só responde a fatores de crescimento e

regula outras funções celulares, sendo a organização da actina/citoesqueleto e a sobrevivência celular as mais conhecidas (TEE, 2018). A atividade imunossupressora da rapamicina e seus derivados (rapalogs) se deve principalmente ao seu efeito inibidor sobre o mTORC1. Como ilustrado na figura B, a rapamicina forma um complexo com moléculas FKBP12 e este complexo inibe a função do mTORC1 (inibição alostérica).

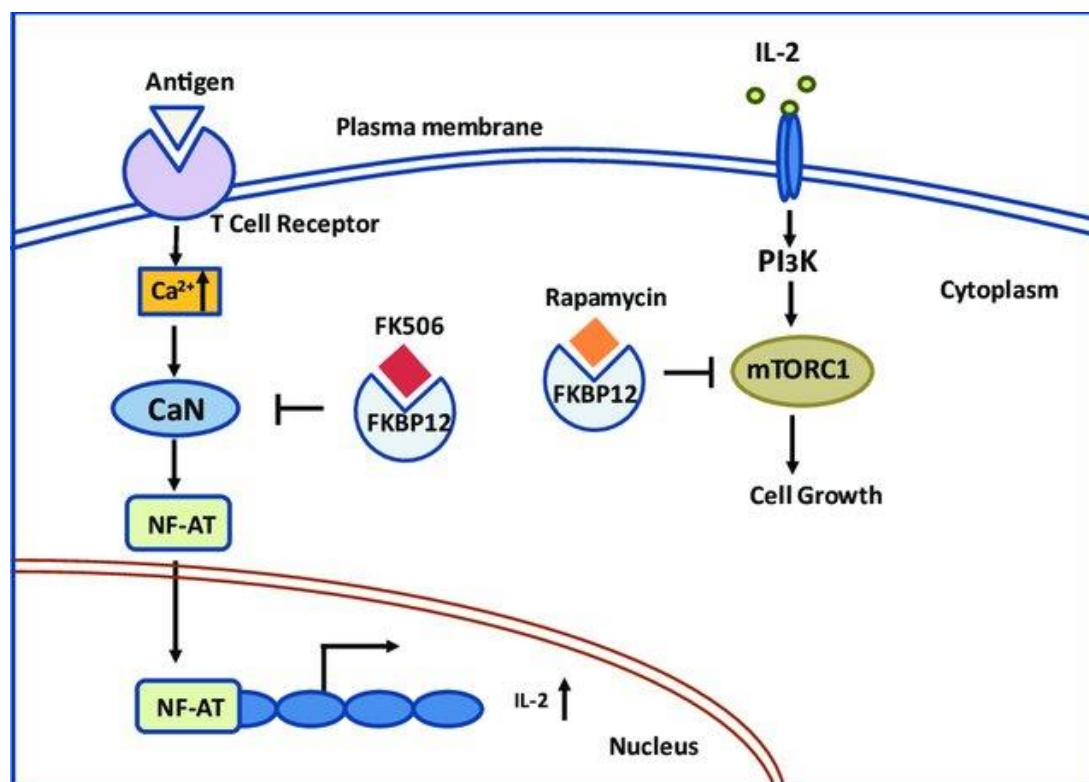


Figura B. Inibição do mTORC1 por rapamicina. Mecanismo de ação de FK506 e rapamicina na ativação de linfócitos T. O FK506 liga-se ao FKBP12 citosólico formando o complexo FKBP12-FK506. Este complexo inibe a desfosforilação de NFATs dependente de calcineurina (CaN) no citoplasma e previne sua translocação nuclear e a transcrição de genes de ativação de células T. A rapamicina também forma um complexo com FKBP12. No entanto, este complexo tem como alvo mTORC1 bloqueando a progressão do ciclo celular. Figura retirada de (TONG; JIANG, 2015).

Uma das principais atividades supressoras atribuídas à rapamicina é a inibição da proliferação das células T induzida por IL-2 (BENJAMIN et al., 2011). Além de exercer potente efeito imunossupressor em linfócitos específicos para o antígeno, a rapamicina também modula a imunidade adaptativa através de interação com células da imunidade inata (células dendríticas e macrófagos) (KATHOLNIG et al., 2013). Os possíveis efeitos da inibição do mTORC1 na resposta imune são ilustrados na figura C. Como pode se observar, o efeito da rapamicina é complexo e inclui também alguns efeitos positivos na resposta imune

como, por exemplo, ativação de células dendríticas e de células TCD8⁺ de memória em resposta à vacinação por vírus.

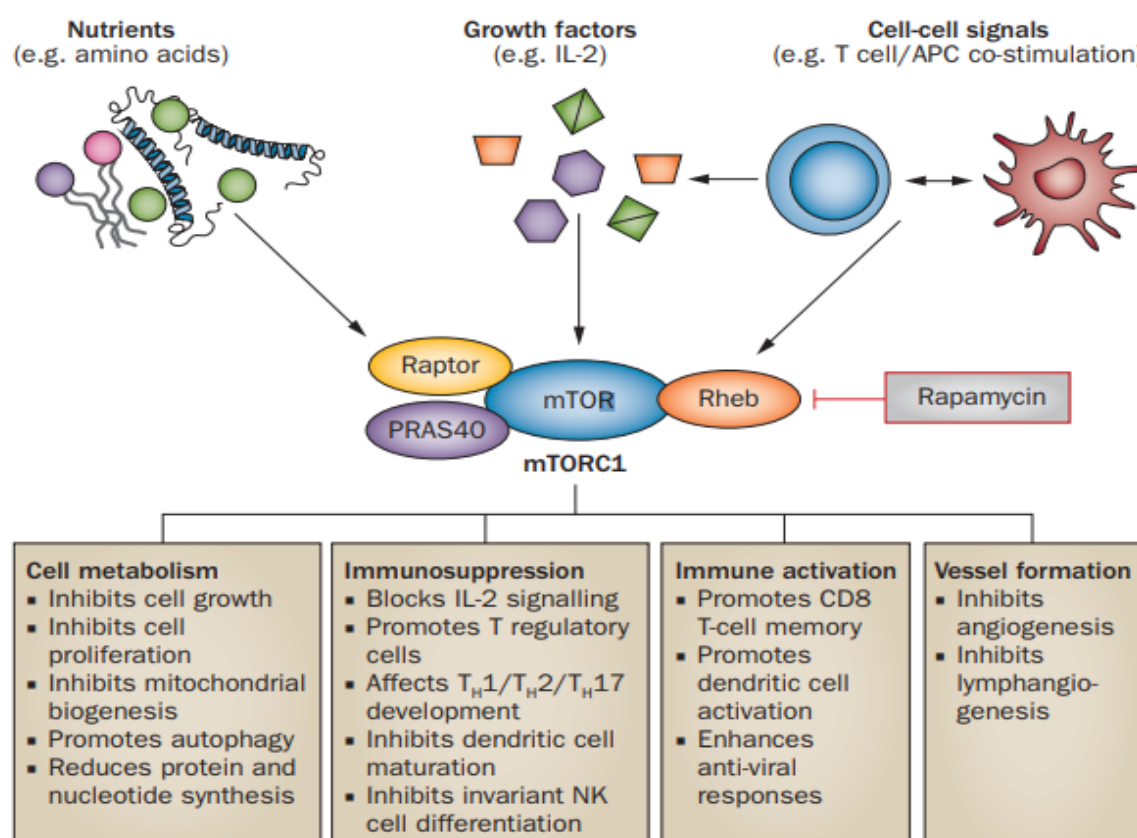


Figura C. Efeito da rapamicina sobre a resposta imune. Os efeitos da rapamicina sobre a resposta imune são geralmente de supressão e estão associados com o mTORC1. Entretanto, alguns efeitos ativadores e sobre a angiogênese também foram constatados. Figura retirada de (GEISSLER, 2015).

A escolha da rapamicina para ser testada neste trabalho foi baseada inicialmente na sua atividade imunossupressora sobre várias doenças autoinflamatórias e autoimunes incluindo colite (YIN et al., 2013), miosite (PREVEL et al., 2013), síndrome linfoproliferativa autoimune (TEACHEY et al., 2006) e diabetes (HE et al., 2016). Também consideramos o fato de que a sinalização via mTOR está envolvida em várias etapas do funcionamento normal e anormal do sistema nervoso central (SNC) (TAKEI; NAWA, 2014).

Em função de suas propriedades imunossupressoras, a rapamicina poderá ser futuramente empregada no tratamento da EM. Alguns ensaios pré-clínicos foram realizados com modelos experimental desta doença e os resultados serão descritos no final deste capítulo.

2. Esclerose múltipla e encefalomielite autoimune experimental

A EM é uma das patologias progressivas mais prevalentes do SNC. É considerada um distúrbio autoimune caracterizado por inflamação, desmielinização e extensão variável de perda axonal (GHASEMI; RAZAVI; NIKZAD, 2017). Afeta aproximadamente 2,5 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo mais comum em adultos jovens (DENDROU; FUGGER; FRIESE, 2015). É causa de grande impacto socioeconômico, pois esses adultos jovens estão em idade economicamente ativa, constituindo família e construindo carreira profissional (DENDROU; FUGGER; FRIESE, 2015).

A prevalência da EM é estimada em aproximadamente 2,3 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo que a incidência é 2 a 3 vezes superior no sexo feminino (ALONSO; HERNÁN, 2008; BROWNE et al., 2014). Acomete 30 pessoas para cada 100.000 habitantes na Europa, seguida pelo Mediterrâneo Oriental (14,9 a cada 100.000), Continente Americano (8,3 a cada 100.000) e com menor prevalência na África (0,3 a cada 100.000) (WORLD HEALTHY ORGANIZATION, 2008). Atualmente estima-se que 35 mil brasileiros estejam afetados pela doença, sendo a maior prevalência em Santos e Itapira no estado de São Paulo (FRAGOSO; PERES, 2007).

A etiologia da EM né multifatorial, acredita-se que o resultando da interação entre fatores ambientais e genéticos (MARRIE, 2004). Um forte candidato genético responsável pela maior susceptibilidade é o alelo HLA-DRB1*1501 (SCHMIDT; WILLIAMSON; ASHLEY-KOCH, 2007). Outros aspectos relevantes determinados através de estudos epidemiológicos são os fatores ambientais tais como infecção pelo vírus Epstein–Barr, tabagismo e nível de exposição solar. Tem sido descrito que nas regiões setentrionais, onde a prevalência de EM é mais elevada, a exposição solar é menor e faz com que os níveis de vitamina D, os quais são estimulados pela luz solar, sejam menores. Os efeitos moduladores da vitamina D tanto na imunidade inata quanto adaptativa poderão explicar a relevância deste fator ambiental na patogênese da EM (ASCHERIO; MUNGER; LÜNEMANN, 2012; PIERROT-DESEILLIGNY; SOUBERBIELLE, 2010).

A apresentação clínica da EM pode variar bastante entre os pacientes sendo geralmente caracterizada por ataxia, hemiparesia ou paraparesia. É caracterizada por episódios agudos (surtos) da doença, com perda gradual e progressiva da função neurológica. Pode ser classificada em quatro subtipos ou formas independentes: remitente-recorrente, progressiva primária, progressiva secundária e progressiva recorrente, sendo o primeiro subtipo a forma mais comum e que ocorre em 85% dos casos (SUNEETHA; RAJA

RAJESWARI, 2016).

A dificuldade do diagnóstico se deve à variedade de sintomas e semelhança dos mesmos com manifestações clínicas encontradas em outras patologias do SNC (DENDROU; FUGGER; FRIESE, 2015). A maioria dos pacientes apresenta inicialmente um quadro transitório de sintomas com períodos de exacerbação e remissão da doença, seguido por fase secundária progressiva que caracteriza-se por perdas irreversíveis e neurodegeneração (FLETCHER et al., 2010; KAPPOS et al., 2010).

Parte significativa do conhecimento acerca da imunopatogênese da EM advém de dados obtidos no principal modelo animal correspondente, conhecido como encefalomielite autoimune experimental (EAE). Além de permitir estudos sobre a imunopatogênese, este modelo animal também é amplamente utilizado para investigar alternativas de tratamentos imunomoduladores. Distintos antígenos derivados do SNC têm sido utilizados para induzir a EAE em diferentes linhagens de camundongos (MIX et al., 2010). São exemplos de alguns dos antígenos empregados na indução da EAE: proteína básica de mielina (MBP), glicoproteína de mielina do oligodendrócito (MOG) e peptídeos derivados destas proteínas. A indução da doença no animal requer imunização com o antígeno emulsificado com Adjuvante Completo de Freund (ACF) e a inoculação de toxina derivada da bactéria *Bordetella pertussis*. Diferentes animais podem ser utilizados para indução de EAE, incluindo primatas e roedores. Dentre estes, as linhagens de camundongos isogênicos têm sido amplamente empregadas, possibilitando variações no desenvolvimento da EAE que permitem responder de maneira mais adequada aos diferentes questionamentos. As linhagens de camundongos isogênicos C57BL/6 e SJL têm sido utilizadas como modelos para mimetizar decurso crônico e/ou de exacerbação-remissão, respectivamente, que são as formas mais frequentes de EM (CROXFORD; KURSCHUS; WAISMAN, 2011; GOLD; LININGTON; LASSMANN, 2006). A imunização de camundongos C57BL/6 com o peptídeo 35-55 derivado de MOG, por exemplo, desencadeia uma doença neurológica caracterizada por paralisia e também um extenso processo de desmielinização. Os animais desenvolvem doença crônica que perdura por, pelo menos, 45 dias (BERNARD et al., 1997).

Em termos de imunopatogênese, dados derivados de doença humana e experimental indicam que o desenvolvimento da doença inclui as seguintes etapas:

- I. ativação periférica de linfócitos T específicos para mielina (ALMOLDA; GONZÁLEZ; CASTELLANO, 2010);
- II. migração destas células para o SNC (SCHULZ; ENGELHARDT, 2005);

- III. reativação das células T no SNC por reconhecimento de autoantígenos na superfície de células apresentadoras de antígenos (LODYGIN; FLÜGEL, 2016);
- IV. inflamação local (neuroinflamação) associada com ativação do inflamassoma e geração de estresse oxidativo (FREEMAN; TING, 2016);
- V. desmielinização e disfunção neuroral (LUBETZKI; STANKOFF, 2014; OSORIO-QUEREJETA et al., 2017).

A EAE tem sido classicamente considerada uma doença mediada por células Th1 específicas para mielina que migram da periferia para o SNC. Esta participação tem sido confirmada através de diferentes procedimentos experimentais. Por exemplo, células Th1 específicas para mielina transferem adotivamente a doença e também tem sido demonstrado que as citocinas pró-inflamatórias produzidas por estas células, tais como IFN- γ e TNF- α , danificam a bainha de mielina (KLINKERT et al., 1997; SUN et al., 2004).

De maneira similar ao que é observado na EM, as células Th17 desempenham um papel crítico na patogênese da EAE. Por exemplo, animais deficientes de IL-17 desenvolvem EAE mais tardiamente e com sintomatologia mais branda (KOMIYAMA et al., 2006). A observação de que células Th17 específicas para mielina podem determinar o desenvolvimento da EAE após transferência adotiva destas células comprovam a relevância do seu papel na EAE (AWASTHI; MURUGAIYAN; KUCHROO, 2008). Além disto, esta citocina participa da ruptura da barreira hematoencefálica (BHE), o que é considerado um evento essencial para o início da inflamação local. A IL-17 também auxilia na migração de células inflamatórias para o SNC e estimula a produção de espécies reativas de oxigênio acarretando redução da expressão de moléculas de junção das células endoteliais (HUPPERT et al., 2010).

Células da imunidade inata, tais como neutrófilos e macrófagos, também participam ativamente da doença determinando disfunções neurológicas (GANDHI; LARONI; WEINER, 2010; HEMMER; KERSCHENSTEINER; KORN, 2015; HERNÁNDEZ-PEDRO et al., 2013). Outra população celular importante neste processo é a microglia. As células da microglia fazem parte do grupo denominado células da neuroglia existentes no SNC: astrócitos, oligodendrócitos e microglia. Como o nome indica, as células da microglia são menores. Estas células compartilham várias propriedades com os macrófagos sendo consideradas células da imunidade inata residentes no SNC.

3. Aspectos terapêuticos na EM

O tratamento da EM tem como objetivo principal impedir a progressão da doença e, portanto, o agravamento da incapacidade neurológica (COMPSTON, 2004). O tratamento disponível para os pacientes com EM varia nos diferentes países, mas de maneira geral, são baseados principalmente em fármacos imunomoduladores visando redução da gravidade e da frequência de recidivas, uma vez que não há cura para a doença (DAMAL; STOKER; FOLEY, 2013). Os corticosteroides são usualmente utilizados na fase aguda da doença enquanto que fármacos imunomoduladores, tais como o IFN- β e o acetato de glatirâmer, são utilizados em pacientes com quadros de exacerbação e remissão da doença (GOLD; WOLINSKY, 2011; RUDICK, 2005). Esses dois medicamentos impedem ativação, proliferação e migração de células inflamatórias para o SNC (GOLD; WOLINSKY, 2011).

Pacientes que não respondem bem a essa primeira linha de tratamento são submetidos ao uso do natalizumabe, um anticorpo monoclonal que se liga à cadeia $\alpha 4$ da integrina VLA-4, inibindo a adesão entre linfócitos e células endoteliais dos vasos sanguíneos no SNC, reduzindo assim o tráfego de linfócitos através da BHE (POLMAN et al., 2006). O fingolimode, disponibilizado para uso clínico desde 2010, sequestra os linfócitos nos órgãos linfóides secundários atuando sobre o receptor para esfingosina-1-fosfato (S1P). Essa terapia é capaz de reduzir o infiltrado inflamatório no SNC por impedir a migração de linfócitos ativados e também por possuir um efeito neuroprotetor direto nas células do SNC (AKTAS et al., 2010; SLOWIK et al., 2015).

Apesar da variedade de condutas terapêuticas aprovadas para o tratamento da EM, essas medicações possuem custo muito elevado, estão associadas com vários efeitos colaterais e não são eficazes em todos os pacientes. Portanto, ainda há a necessidade de se investigar novas estratégias terapêuticas.

Como dissemos anteriormente, o potencial terapêutico da rapamicina vem sendo testado em modelo experimental e também em pacientes com EM (BAGHERPOUR et al., 2018). A participação da via de sinalização da rapamicina (mTOR) em doenças neurológicas vem sendo amplamente estudada. Um aspecto importante que decorreu da descoberta de mTOR é que os inibidores farmacológicos desta via, como sirolimus e everolimus, mostraram benefícios clínicos em alguns distúrbios neurológicos, como na esclerose tuberosa, e já são considerados para ensaios clínicos em epilepsia, autismo, demência, traumatismo crânio encefálico e acidente vascular cerebral (CRINO, 2016).

Alguns estudos empregando a rapamicina no modelo de EAE sugerem que este

fármaco possa ser uma opção terapêutica para o tratamento da EM. Hou e colaboradores (HOU et al., 2017) mostraram que a terapia com rapamicina inibiu o desenvolvimento da EAE, reduzindo o infiltrado inflamatório no SNC. Os autores associaram o efeito protetor à inibição da via de sinalização mTOR-STAT3, impedindo a função e a diferenciação das células Th1. No modelo de EAE do tipo recorrente-remitente (EAE-RR), a rapamicina preveniu a indução e a progressão da doença. Este efeito benéfico foi associado à supressão da função das células T efectoras e aumento simultâneo da porcentagem de células T reguladoras (ESPOSITO et al., 2010). Análises histopatológicas em amostras de cérebro revelaram uma melhora na mielinização da substância branca em animais tratados com rapamicina. Além disso a rapamicina foi capaz de reduzir os sinais de dor neuropática (O'CONNOR et al., 2008).

O tratamento de células da microglia com rapamicina evidenciou que o mTOR controla seletivamente a ativação microglial em resposta às citocinas pró-inflamatórias induzidas por lipopolissacarídeo (LPS) (DELLO RUSSO et al., 2009). Os autores sugerem, portanto, que esse fármaco pode ser uma ferramenta farmacológica útil para reduzir a neuroinflamação (DELLO RUSSO et al., 2009).

4. Microglia: participação na imunopatogênese e alvo terapêutico da rapamicina

Células da microglia desenvolvem-se a partir de uma célula progenitora microglial eritro-mielóide presente no saco vitelino e que migram para o cérebro nos primeiros dias de desenvolvimento. A diferenciação destas células é, portanto, distinta de outros macrófagos teciduais que têm um desenvolvimento mais tardio e passam pelo fígado fetal antes de migrar para seus tecidos específicos (GINHOUX; GUILLIAMS, 2016; KIERDORF et al., 2013).

De forma similar aos macrófagos, as células da microglia expressam moléculas de histocompatibilidade (MHC) I e II, secretam citocinas pró e anti-inflamatórias e expressam receptores para Fc e para componentes do sistema complemento (LUO et al., 2017). Estas células participam tanto da patogênese quanto da reparação do tecido nervoso lesado. No primeiro caso da patogênese funcionam como células apresentadoras de antígenos (APCs), secretam citocinas pró-inflamatórias e danificam a bainha de mielina e os oligodendrócitos (LULL; BLOCK, 2010). Por outro lado, podem promover remielinização através da expressão de moléculas anti-inflamatórias, fagocitose de debris e reparo do tecido lesado (MCMURRAN et al., 2016). Estas funções aparentemente antagônicas têm sido associadas com fenótipos distintos da microglia classificados como M1 e M2, de forma similar à

classificação adotada para os macrófagos. A microglia M1 promove inflamação e danos nos oligodendrócitos enquanto que a microglia M2 regula funções imunes promotoras de reparo no SNC. A microglia M1 produz mediadores pró-inflamatórias tais como IL-1 β , TNF- α e NO sintase. Já a microglia M2 produz citocinas anti-inflamatórias, como por exemplo IL-10, expressa receptor para manose e secreta arginase (XU et al., 2017).

Em termos de polarização das células da microglia, são discutidos na literatura dois aspectos considerados importantes no contexto desse projeto. O primeiro deles refere-se a ativação clássica denominada perfil M1, o qual caracteriza um fenótipo pró-inflamatório. O processo de polarização para o perfil M1 depende dos estímulos iniciais recebidos por estas células e resulta na produção de citocinas inflamatórias e espécies reativas de oxigênio, podendo determinar a morte destas células e danos no tecido (CHERRY; OLSCHOWKA; O'BANION, 2014). O segundo aspecto se refere à possibilidade de alteração do perfil M1 das células da microglia para o perfil M2, visando neuroproteção. O perfil M2 apresenta um fenótipo anti-inflamatório envolvido na reparação e eliminação de detritos teciduais (GIUNTI et al., 2014).

Como esclarecido anteriormente, células Th1 e Th17 específicas para mielina são fundamentais na imunopatogênese da EAE. Também é sabido que o IFN- γ produzido por células Th1 é um polarizador potente de macrófagos para o perfil M1. Neste contexto, se acredita que níveis elevados desta citocina contribuem para a polarização M1 da microglia na EM e na EAE. Evidências indicam a participação da microglia na desmielinização: localização com lesões na bainha de mielina, presença de proteína básica da mielina (MBP) dentro dessas células, atenuação da doença experimental em camundongos com microglia depletada e atenuação doença em animais tratados com inibidores de microglia (BHASIN; WU; TSIRKA, 2007; CHERRY; OLSCHOWKA; O'BANION, 2014; HEPPNER et al., 2005).

Muitos trabalhos têm sido realizados para investigar a possível participação da célula da microglia em processos neurodegenerativos. Uma opção bastante prática neste sentido é o uso de linhagens celulares de microglia tais como N9 e BV-2 (BLASI et al., 1990; CORRADIN et al., 1993). A linhagem BV-2 (código BCRJ 0356) foi gerada a partir de tecido cerebral de camundongo neonato da linhagem C57BL/6 e a imortalização destas células foi conseguida por infecção com um retrovírus recombinante (v-raf/v-mic) (BLASI et al., 1990). Estas células são levemente aderentes, crescem tanto aderidas quanto em suspensão e são, em termos morfológicos, fenotípicos e funcionais semelhantes aos macrófagos. Esta linhagem celular tem sido considerada um substituto válido para estudos com microglia primária

(GIULIAN; BAKER, 1986). Neste sentido, Henn et al. (HENN et al., 2009) avaliaram vários parâmetros tais como resposta ao estímulo com LPS, através de análise proteômica e transcriptômica, produção de NO e resposta à presença de IFN- γ . Ficou demonstrado que esta linhagem celular responde de forma bastante similar a da microglia primária. Os autores também constataram que esta célula interage de forma apropriada com linfócitos T e neurônios (HENN et al., 2009).

Estudos envolvendo células da microglia constituem uma área em evidente expansão em pesquisa biomédica. Estes estudos vêm sendo realizados tanto com cultivos primários de microglia derivada do SNC de animais de experimentação quanto de linhagem celulares de microglia murina ou humana imortalizadas. A linhagem murina BV-2 é considerada um substituto válido para microglia primária em diferentes tipos de estudo (HENN et al., 2009) e por isso foi utilizada neste projeto.

Vários protocolos experimentais tem demonstrado que a rapamicina é capaz de modular a microglia. Xie e colaboradores (XIE et al., 2014) injetaram este fármaco no cérebro de ratos 6 horas após infarto isquêmico. Este tratamento reduziu o volume da lesão, melhorou as deficiências comportamentais e reduziu significativamente a produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos e microglia. Utilizando este mesmo modelo de infarto isquêmico em camundongos, Li e colaboradores (LI; KIM; BLENIS, 2014) observaram, que os inibidores de mTORC1, sirolimus e everolimus, também determinaram redução no tamanho das lesões e queda na produção de citocinas pró-inflamatórias. Segundo os autores, este efeito foi devido a uma mudança no fenótipo da microglia de M1 para M2.

Em modelo de doença de Parkinson (JIN et al., 2018), a rapamicina induziu aumento da autofagia associado com polarização das células da microglia para M2. Já está bem estabelecido que a autofagia é um mecanismo celular fundamental para manter a homeostasia celular. Durante este fenômeno a célula digere constituintes do seu citoplasma para reciclagem, para eliminação de organelas danificadas e também para eliminar patógenos intracelulares (GLICK; BARTH; MACLEOD, 2010). Bussi e colaboradores. (BUSSI et al., 2017) observaram que a rapamicina inibiu a produção de citocinas e de óxido nítrico em células da microglia da linhagem BV-2 estimuladas com LPS através de ativação de autofagia nestas células.

Justificativa

A rapamicina possui um potente efeito imunossupressor, principalmente sobre os linfócitos T, mas também sobre células da resposta imune inata, incluindo macrófagos e microglia. Isso se deve ao seu efeito inibidor sobre o alvo mTOR que desempenha importante papel no metabolismo e na ativação celular. O potencial da rapamicina no tratamento de doenças neurodegenerativas, como a EM, se deve em parte à sua capacidade de atravessar facilmente a BHE, exercendo assim efeito direto sobre leucócitos residentes ou infiltrantes no SNC.

Nossa hipótese de trabalho é que a rapamicina tenha efeito supressor *in vitro* sobre células esplênicas e derivadas do SNC de camundongos com EAE e também sobre linhagem celular da microglia. Esta possível imunossupressão ocorreria pela ação da rapamicina sobre o complexo mTOR, resultando no bloqueio da progressão do ciclo celular e da sinalização da IL-2, interferindo assim na diferenciação e ativação de células T e células da microglia.

Considerando que a rapamicina já vem sendo testada em modelos animais e também em pacientes com EM e ainda a necessidade de estratégias alternativas e eficazes para estudos de seleção de novos fármacos, acreditamos que, se confirmada nossa hipótese, outras moléculas candidatas à terapia de doenças neurodegenerativas possam ser inicialmente rastreadas usando essa abordagem.

Objetivos

Objetivo geral

Investigar o efeito *in vitro* da rapamicina em células envolvidas na imunopatogênese da EAE.

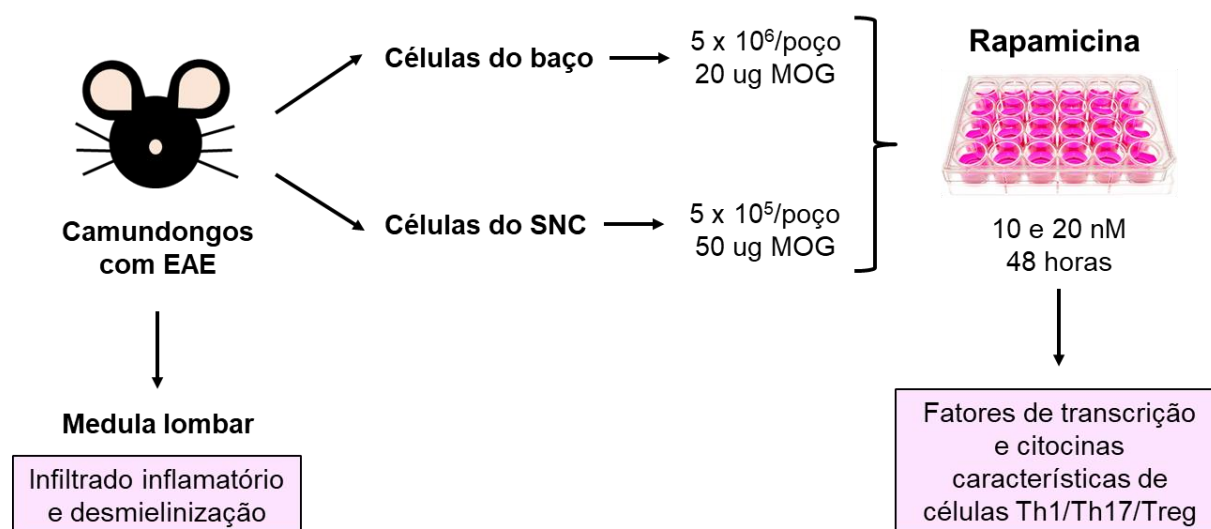
Objetivos específicos

- I. Avaliar o efeito da rapamicina na expressão gênica dos fatores de transcrição associados às subpopulações de linfócitos T auxiliares (Th1/Th2/Th17/Treg) em células esplênicas e células do SNC de camundongos com EAE.
- II. Avaliar o efeito da rapamicina na produção de citocinas associadas às subpopulações de linfócitos T auxiliares (Th1/Th2/Th17/Treg) por células esplênicas e células do SNC de camundongos com EAE.
- III. Avaliar o efeito da rapamicina na produção de citocinas (TNF- α , IL-6 e IL-10), na expressão gênica de moléculas envolvidas com ativação (TREM2, ARG1, iNOS e NF- κ B) e na expressão de moléculas de superfície (MHC II, CD40 e CD86) em linhagem celular da microglia.

Protocolos experimentais

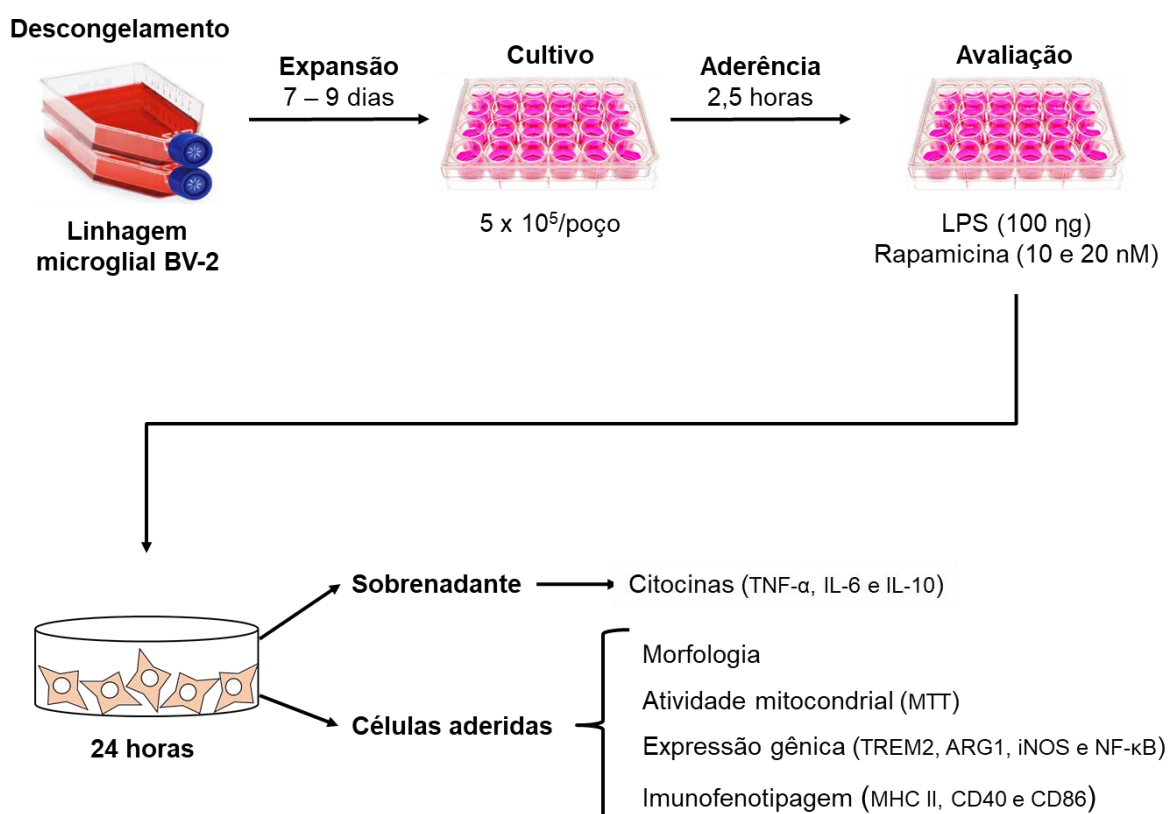
Protocolo experimental I

Objetivo: avaliar o efeito da rapamicina na expressão gênica dos fatores de transcrição e na produção de citocinas associados às subpopulações de linfócitos T auxiliares (Th1/Th2/Th17/Treg) em células esplênicas e células do SNC de camundongos com EAE.



Protocolo experimental II

Objetivo: avaliar o efeito da rapamicina na produção de citocinas, na expressão gênica de moléculas envolvidas com ativação e na expressão de moléculas de superfície em células da microglia da linhagem celular BV-2.



Métodos

1. Animais

Foram utilizadas fêmeas de camundongos C57BL/6 com 9 semanas de idade, provenientes da Universidade de São Paulo (USP, Ribeirão Preto, SP, Brasil) e mantidas em condições ambientais de esterilidade através de rack ventilada (Alesco®, Monte Mor, SP, Brasil) no biotério do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB-UNESP, Botucatu, SP, Brasil). Cada gaiola continha no máximo cinco camundongos, com ração comercial e água filtrada *ad libitum*, ambas autoclavadas. Os animais foram eutanasiados com anestésico (xilazina e quetamina) e perfundidos com tampão fosfato estéril antes da coleta do material biológico. Os experimentos foram realizados segundo os regulamentos do Comitê de Ética e Uso de Animais (protocolo 1118-CEUA IBB, Unesp, Botucatu, SP, Brasil).

2. Indução de EAE e avaliação clínica

A encefalomielite autoimune experimental (EAE) foi induzida por imunização subcutânea no dorso com 100 µg de MOG35-55 (*Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein*, Genemed Synthesis Inc., Texas, EUA) emulsificada com de adjuvante completo de Freund (ACF, Sigma-Aldrich Corp., Missouri, EUA) contendo *Mycobacterium tuberculosis* (2 ou 4 mg/mL). No dia da imunização e 48 horas depois, os animais foram inoculados com 200 ng de toxina derivada de *Bordetella pertussis* (Sigma) via intraperitoneal. O escore clínico da doença foi avaliado diariamente até a fase aguda, no dia 16 após indução da EAE. A gravidade da doença foi definida seguindo a escala de escore clínico: 0- ausência de sinais clínicos; 1- cauda frouxa; 2- perda da tonicidade do movimento do quadril; 3- paralisia parcial das patas traseiras; 4- paralisia total das patas traseiras; 5- tetraplegia ou morte.

3. Análise histopatológica

Amostras de medula lombar dos animais com EAE foram coletados 16 dias após a indução da EAE. Este órgão foi fixado em formalina tamponada (10%) durante 24 horas, lavado em água corrente durante 18 horas e, em seguida, incluído em Paraplast Plus (McCormick). As amostras foram cortadas com 5 µm de espessura com auxílio de um micrótomo (Leica, RM2245). As lâminas foram coradas com Hematoxilina-Eosina (H&E) e

com Luxol Fast Blue (LFB) e três amostras de cada grupo foram analisadas em microscópio óptico (Olympus BX60) no aumento de 10X. As imagens foram adquiridas por meio de câmera digital acoplada ao microscópio.

4. Cultura de células esplênicas

Os baços dos animais com EAE foram coletados e processados assepticamente. Para cultura de células esplênicas, este órgão foi desagregado mecanicamente com pistilo e as hemácias foram lisadas com tampão contendo NH_4Cl por 5 min. à temperatura ambiente. Esta suspensão foi centrifugada e o pellet de células ressuspensão em meio RPMI-1640 (Sigma) contendo soro bovino fetal (10%, Gibco), L-glutamina ($2 \mu\text{M}$, Sigma) e antibiótico/antimicótico (0,1%, Sigma). Para a indução da produção de citocinas, as células totais foram distribuídas em placas de 48 poços (5×10^6 células/poço em 1mL), estimuladas com MOG ($20 \mu\text{g/mL}$) e simultaneamente tratadas com rapamicina (10 e 20 nM) e então incubadas em estufa à 37°C e 5% CO_2 durante 48 horas. Os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -20°C para posterior dosagem de citocinas e as células foram armazenadas a -80°C para posterior análise de expressão gênica por PCR.

5. Cultura de células do SNC

Amostras de cérebro e medula espinhal (porção cervical e torácica) dos animais com EAE foram coletadas e processadas assepticamente. Para cultura de células, o SNC foi desagregado mecanicamente com pistilo e incubado com colagenase D ($2,5 \text{ mg/mL}$, Roche) e 10 μL de DNase (100 ug/mL) em 4 mL de meio RPMI-1640 durante 45 minutos em estufa de CO_2 a 37°C . Após este período as amostras foram processadas em *cellstrainer* e transferidas para tubos contendo HBSS (Hank's Balanced Salt Solution). Os tubos foram centrifugados a $450 \times g$ por 7 minutos e os *pellets* foram então ressuspensos em 6mL de Percoll 37% (GE Healthcare). Esta suspensão foi adicionada lentamente sobre 3 mL de Percoll 70% em tubos de 15 mL e centrifugada a $950 \times g$ por 20 minutos à temperatura ambiente em centrífuga com o freio e aceleração desativados. Ao final da centrifugação, a fase superior contendo grande concentração de mielina foi coletada por sucção e desprezada. O anel contendo células mononucleares foi coletado e transferido para tubos de 15 mL aos quais se adicionou RPMI-1640 suplementado contendo soro bovino fetal (10%, Gibco), L-glutamina ($4 \mu\text{M}$, Sigma), aminoácidos não essenciais (1%, Sigma), piruvato (1%, Sigma) e antibiótico/antimicótico (0,1%, Sigma). As células foram então centrifugadas a $450 \times g$ a 4°C por 10 minutos. Para a indução da produção de citocinas, as células totais foram distribuídas em placas de 24 poços

(5×10^5 células/poço em 0,5 mL), estimuladas com MOG (50 $\mu\text{g/mL}$) e simultaneamente tratadas com rapamicina (10 e 20 nM) e então incubadas em estufa à 37°C e 5% CO_2 durante 48 horas. Os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -20°C para posterior dosagem de citocinas e as células foram armazenadas a -80°C para posterior análise de expressão gênica por PCR.

6. Cultura de linhagem celular BV-2

Células da microglia da linhagem celular BV-2 (BCRJ, código 0356) foram cultivadas e expandidas em frascos de cultura contendo uma área de superfície de 25 cm^2 , com meio DMEM-High Glucose (Gibco) suplementado contendo soro bovino fetal (10%, Gibco), piruvato (1%, Sigma) e antibiótico/antimicótico (0,1%, Sigma). Para a indução da produção de citocinas, as células foram distribuídas em placas de 24 poços (5×10^5 células/poço em 0,5 mL) e incubadas por 2,5 horas para aderência em estufa à 37°C e 5% CO_2 . Após retirada das células não aderentes, as células restantes foram tratadas com rapamicina (10 e 20 nM) e simultaneamente estimuladas com LPS (100 ng/mL, 0111:B4, Sigma) e então incubadas em estufa a 37°C e 5% CO_2 durante 24 horas. Os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -20°C para posterior dosagem de citocinas. As células foram desaderidas utilizando *cell scraper* e preparadas para análises de citometria de fluxo ou armazenadas a -80°C para posterior análise de expressão gênica por PCR. Algumas células, sob as mesmas condições citadas acima, foram cultivadas sobre lamínulas de vidro para posterior coloração com Panótico Rápido (Laborclin, Pinhais, PR, Brazil), seguindo instruções do fabricante.

7. Quantificação de citocinas por ELISA

As citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-5, IL-6, IL-17, IL-10 e TGF- β , foram quantificadas no sobrenadante de culturas de células esplênicas e da linhagem celular BV-2 por ensaio imunoenzimático utilizando o kit comercial para camundongos (R&D Systems) segundo as instruções do fabricante. Os resultados foram adquiridos em leitor *BioTek*® a 450 nm no Departamento de Microbiologia e Imunologia (IBB-UNESP, Botucatu, SP, Brasil) e as análises foram realizadas no software GEN5 Data Analysis Software.

8. Quantificação de citocinas por CBA

A quantificação de citocinas do sobrenadante de culturas de células do SNC foi realizada através do método de CBA (*Cytometric Beads Array*), segundo as instruções do fabricante, utilizando kit comercial para detecção de IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL4, IL-10, IL-6 e

IL-17A (Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit – BD Biosciences). Após distribuir 50 µl das beads de captura nos tubos de ensaio, foram adicionados 25 µl de cada amostra e então incubados durante 2 horas e protegido de luz. As leituras foram realizadas no citômetro de fluxo FACS Canto II (BD Biosciences) no Departamento de Microbiologia e Imunologia (IBB-UNESP, Botucatu, SP, Brasil).

9. Extração de RNA

O RNA total das amostras do SNC foi extraído utilizando o kit RNeasy Mini (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. O *pellet* de células do baço e células da microglia (linhagem BV-2) foram extraídos utilizando o reagente TRIzol™ (Life Technologies, Austin, TX, EUA). O RNA extraído foi ressuspensão em 20 µL de água ultra-pura e livre de endonucleases (DEPC). As amostras de RNA foram quantificadas através do equipamento NanoDrop 2000 e então 200 ng de RNA foram convertidos em cDNA utilizando o kit de Transcrição Reversa de cDNA de Alta Capacidade (Life Technologies) de acordo com as instruções do fabricante.

10. Ensaio de RT-qPCR

A expressão de TBX21 (Mn00450960_m1), RORc (Mm01261022_m1), GATA3 (Mm00484683_m1), FoxP3 (Mm00475162_m1), ARG1 (Mm00475988_m1), TREM2 (Mm00451744_m1), iNOS (Mm00440502_m1), e NF-κB (Mm00482418_m1) foi analisada em comparação com os níveis de GAPDH (Mm99999915_m1). Os níveis de GAPDH (house keeping gene) não foram alterados pelos tratamentos ou estímulos (figura suplementar 1). As reações de PCR em tempo real foram realizadas usando os Ensaio de Expressão Gênica TaqMan™ de acordo com as recomendações do fabricante (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA). Os níveis de expressão gênica foram representados como diferença de expressão relativa usando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

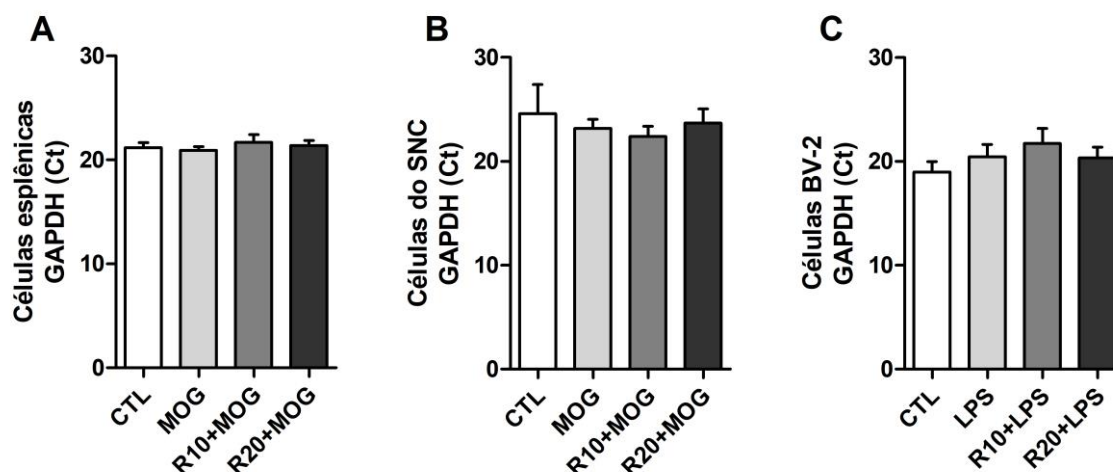


Figura suplementar 1. Efeito da rapamicina na expressão de GAPDH. Células totais do baço (5×10^6 células/poço) e do SNC (5×10^5 células/poço) de camundongos C57BL/6 com EAE foram estimuladas *in vitro* com MOG (20 e 50 $\mu\text{g/mL}$) e simultaneamente tratadas com rapamicina (10 e 20 nM) e incubadas por 48 horas. Células da linhagem microglial BV-2 foram estimuladas *in vitro* com LPS (100 ng/mL) e simultaneamente tratadas com rapamicina (10 e 20 nM) e incubadas por 24 horas. Após o período de cultura, as células foram utilizadas para avaliar a expressão do mRNA do gene endógeno GAPDH (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase). Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média, $n=8$, somatório de 3 experimentos independentes. ANOVA com pós teste de Tukey, letras diferentes representam diferença entre os grupos, $p<0,05$.

11. Atividade celular

O MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) é um sal solúvel em água que reage com as desidrogenases mitocondriais presentes apenas em células metabolicamente ativas resultando na produção de cristais de formazana de cor roxa, insolúveis em água. Esse sal é, portanto, utilizado para verificar a metabolismo mitocondrial e consequentemente a atividade metabólica celular (RAI et al., 2018). A atividade metabólica da linhagem BV-2 foi averiguada após 24 horas de cultura. O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em RPMI-1640 contendo MTT (5 mg/mL). A placa foi então incubada por 2 horas em estufa a 37°C em 5% CO_2 e, após este período, centrifugada por 5 minutos/1500 rpm. O sobrenadante foi retirado e as células ressuspensas em 100 μL de Dimetilsulfóxido (DMSO). Após 5 minutos os resultados foram adquiridos em leitor *BioTek®* a 540 nm no Departamento de Microbiologia e Imunologia (IBB-UNESP, Botucatu, SP, Brasil). O índice de atividade metabólica foi calculado de acordo com a equação: DO da cultura teste / DO da cultura controle.

12. Imunofenotipagem celular por citometria de fluxo

As células da linhagem BV-2 foram incubadas com os seguintes anticorpos marcados com fluorocromos (eBioscience): anti-CD11b-PerCP (M1/70), anti-MHC II-APC (M5/114.15.2), anti-CD40-FITC (1C10) e anti-CD86-PE (GL1). Após incubação por 30 min a 4°C, as células foram lavadas com tampão AutoMacsRunning Buffer (MiltenyiBiotec) e ressuspensas no mesmo tampão. As amostras foram fixadas em paraformaldeído a 1% e as leituras foram feitas utilizando-se o citômetro de fluxo FACS Canto II (BD Biosciences) do Instituto de Biociências (UNESP, Botucatu, SP) com o software FACS Diva, e os dados foram analisados com o software FlowJo (TreeStar).

13. Análise estatística

Inicialmente, todas as amostras foram testadas quanto à normalidade. No caso das variáveis paramétricas, os valores obtidos foram apresentados em média e erro padrão da média (SEM); a comparação entre dois grupos foi realizada por teste t não pareado e entre mais de 3 grupos foi realizada por ANOVA seguida de teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5% e os dados foram analisados pelo pacote estatístico SigmaPlot for Windows version 2.0 (1995, Jandel Corporation, Califórnia, EUA). Os gráficos foram feitos utilizando o programa Graph Pad Prism 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, California, United States).

Resultados

1. Características clínicas e histopatológicas dos animais com EAE

Conforme esperado, as fêmeas de camundongos C57BL/6 imunizadas com MOG desenvolveram os sinais clínicos da encefalomyelite autoimune experimental (EAE), caracterizados por paralisia (figura 1A) e perda de peso corpóreo (figura 1B). Animais que atingiram, pelo menos, o escore dois foram utilizados no estudo. Como mostrado na figura 1C, observamos infiltrado inflamatório co-localizado com áreas de desmielinização principalmente na substância branca da medula lombar.

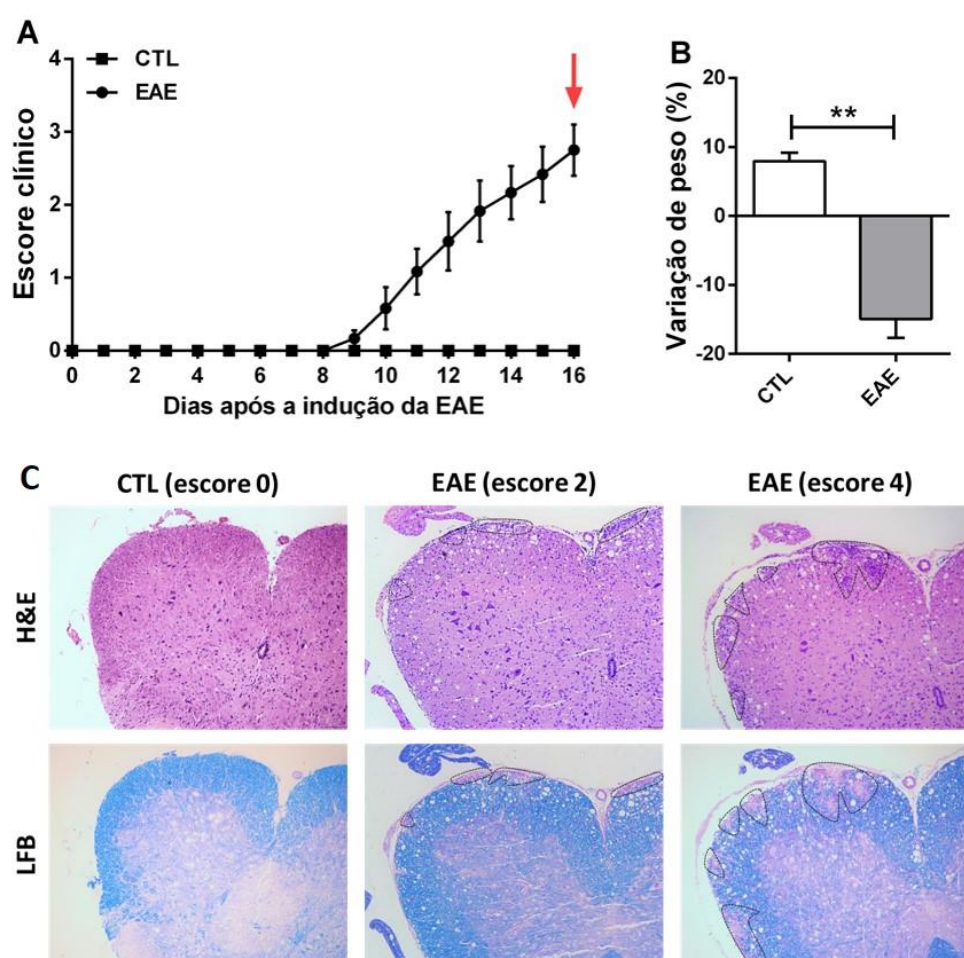


Figura 1. Características clínicas e histopatológicas dos animais com encefalomyelite autoimune experimental utilizados nos experimentos. C57BL/6 fêmeas foram imunizadas com MOG via subcutânea no dorso e inoculadas com toxina pertussis. O escore clínico (A) foi observado diariamente durante 16 dias. A perda de peso (B) foi calculada através do percentual de diferença entre o peso final (dia 16) e o peso inicial (0). O processo inflamatório (hematoxilina-eosina - H&E) e a desmielinização (luxol fast blue - LFB) na medula lombar (C) foram avaliados em animais controles (CTL) e animais com EAE (escores 2 e 4) em microscópio óptico comum no aumento de 10X e encontram-se em destaque na figura. ANOVA com pós teste de Tukey, $p < 0,05$, $n = 4$ /grupo experimental.

2. A rapamicina reduz a produção de IL-17 por células esplênicas de animais com EAE

Acredita-se que a resposta imune periférica seja um evento importante na imunopatogênese da EM. Por isto avaliamos, inicialmente, o efeito *in vitro* da rapamicina sobre células esplênicas. As células esplênicas totais foram estimuladas *in vitro* com MOG na presença de rapamicina e cultivadas por 48 horas. Após este período, avaliamos a expressão relativa de fatores de transcrição e a produção de citocinas consideradas assinaturas de subpopulações de linfócitos T. A presença de 10 e 20 nM de rapamicina não afetou a expressão de TBX21 (figura 2A), RORc (figura 2B), GATA3 (figura 2C) e FoxP3 (figura 2D).

Em relação à produção de citocinas, o tratamento com rapamicina diminuiu de forma significativa a produção de IL-17 (figura 2F). Os níveis de IFN- γ , IL-5, IL-2, TNF- α e IL-6 (figura 2E,G-J) foram discretamente diminuídos na presença de rapamicina.

3. A rapamicina diminui a produção de citocinas encefalitogênicas

Avaliamos a seguir o efeito da rapamicina em células mononucleares eluídas do SNC de camundongos com EAE. De maneira similar ao baço, as células do SNC foram estimuladas *in vitro* com MOG na presença de rapamicina e cultivadas por 48 horas. Após este período, avaliamos a expressão relativa de fatores de transcrição e a produção de citocinas consideradas assinaturas das principais subpopulações de linfócitos T. Como pode se observar na figura 3, não ocorreu redução na expressão de TBX21 (figura 3A) e FoxP3 (figura 3C). No entanto, o tratamento com rapamicina determinou redução significativa na expressão de RORc (figura 3B). O cálculo da relação entre a expressão de FoxP3 e RORc permite visualizar uma proporção maior de Tregs em comparação com as células Th17 (figura 3D).

Em relação à produção de citocinas a rapamicina diminuiu significativamente a produção de IFN- γ (figura 3E), IL-17 (figura 3F), IL-10 (figura 3H) e TNF- α (figura 3I). A presença de rapamicina não afetou significativamente a produção de IL-2 (figura 3G), IL-6 (figura 3J) e TGF- β (figura 3K).

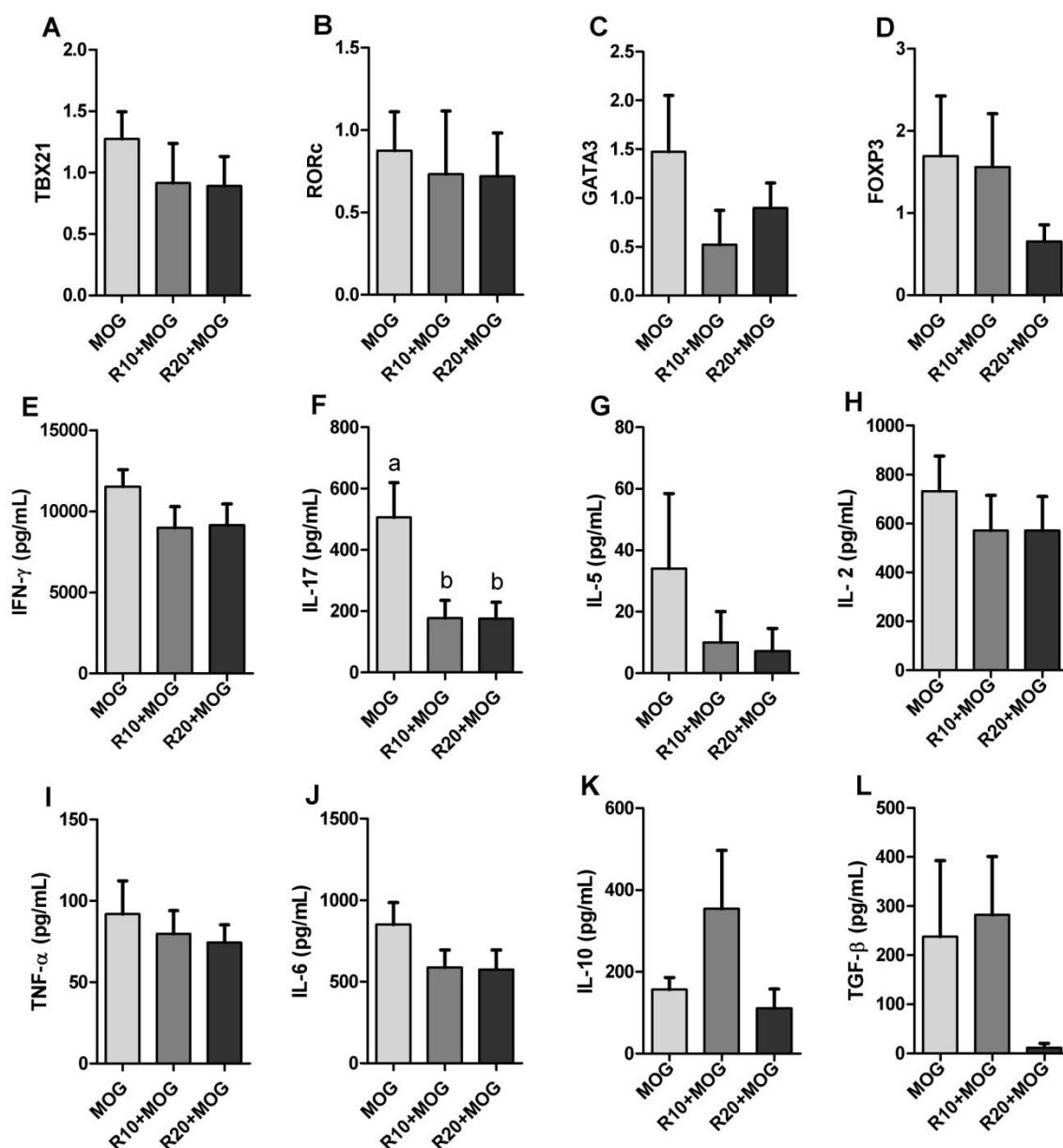


Figura 2. Efeito da rapamicina na expressão de fatores de transcrição e na produção de citocinas por células esplênicas. Células totais do baço de camundongos C57BL/6 com EAE foram estimuladas *in vitro* com MOG (20 ug/mL) e simultaneamente tratadas com rapamicina (10 e 20 nM). Após 48 horas de cultura (5×10^6 células/poço) as células foram utilizadas para avaliar a expressão dos fatores de transcrição TBX21 (A), RORc (B), GATA3 (C) e FOXP3 (D) e o sobrenadante foi utilizado para quantificação das citocinas IFN- γ (E), IL-17 (F), IL-5 (G), IL-2 (H), TNF- α (I), IL-6 (J), IL-10 (K) e TGF- β (L). Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média, n=8, somatório de 3 experimentos independentes. ANOVA com pós teste de Tukey, sem tratamento vs rapamicina 10 nM vs rapamicina 20 nM, $p < 0,05$.

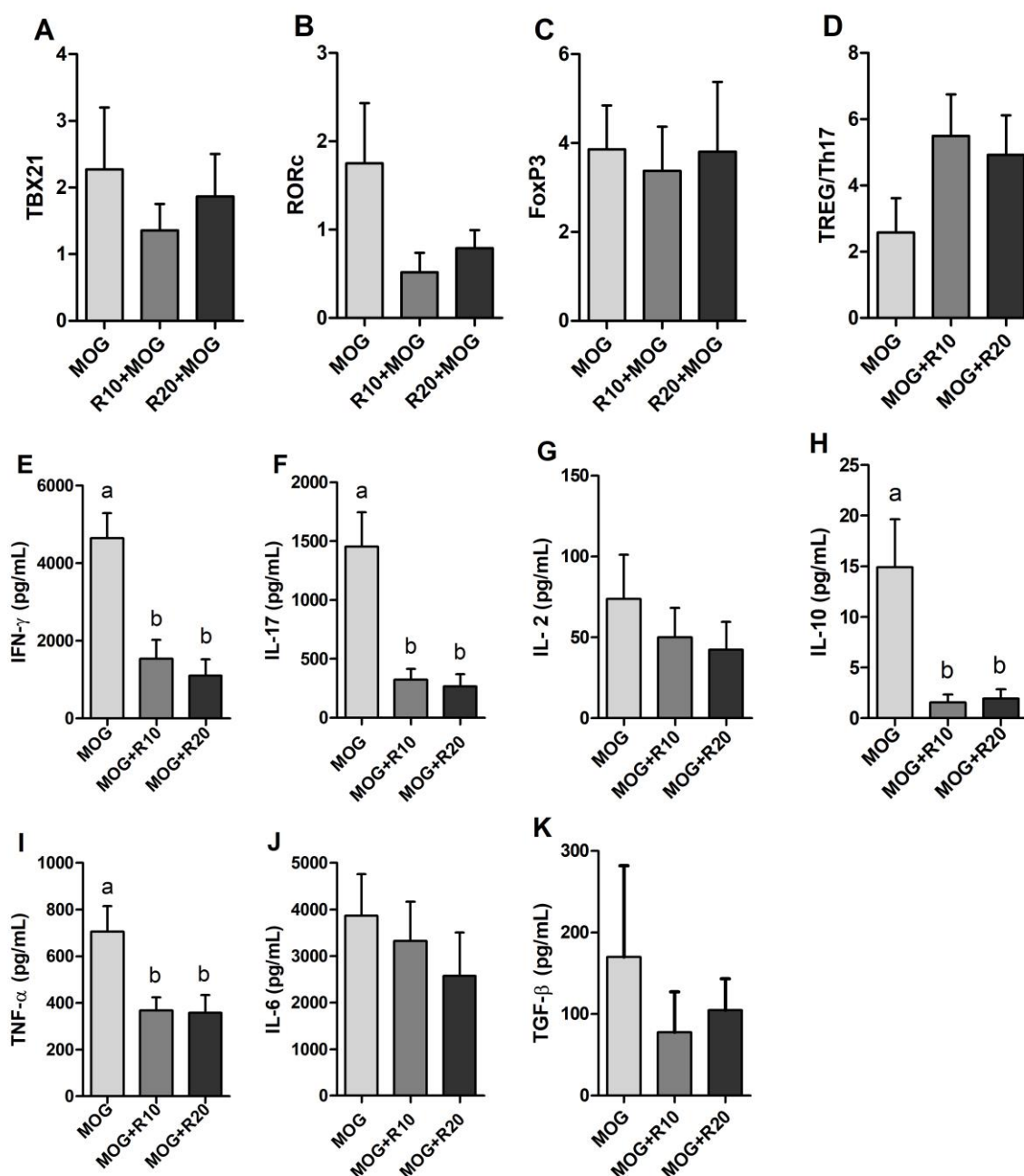


Figura 3. Efeito da rapamicina na expressão de fatores de transcrição e na produção de citocinas por células do SNC. Células totais do SNC de camundongos C57BL/6 com EAE foram estimuladas *in vitro* com MOG (50 ug/mL) e simultaneamente tratadas com rapamicina (10 e 20 nM). Após 48 horas de cultura (5×10^5 células/poço) as células foram utilizadas para avaliar a expressão dos fatores de transcrição TBX21 (A), RORc (B) e FOXP3 (C) e o sobrenadante foi utilizado para quantificação das citocinas IFN- γ (E), IL-17 (F), IL-2 (G), IL-10 (H), TNF- α (I), IL-6 (J) e TGF- β (K). A razão (D) entre células reguladoras (TREG) e células efectoras (Th17) foi calculada utilizando os valores de expressão dos genes FOXP3 e RORc, respectivamente. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média, $n=8$, somatório de 3 experimentos independentes. ANOVA com pós teste de Tukey, sem tratamento vs rapamicina 10 nM vs rapamicina 20 nM, $p < 0,05$.

4. A rapamicina induz um perfil M2 em células da microglia

Como a microglia é uma das populações de células do sistema imune residentes no SNC e que participa ativamente da EAE, testamos o efeito da rapamicina em células BV-2, uma linhagem microglial de origem murina.

Inicialmente investigamos o efeito da rapamicina na atividade metabólica, como indicado na figura 4A. O ensaio do MTT mostrou que o tratamento com rapamicina (10 e 20 nM) não afetou a atividade metabólica destas células. No entanto, a estimulação com LPS, utilizado como controle positivo de ativação da microglia, reduziu significativamente a atividade mitocondrial destas células, mesmo na presença de rapamicina. O tratamento com rapamicina restaurou, pelo menos em parte, as projeções citoplasmáticas inicialmente reduzidas devido à estimulação com LPS (figura 4B).

Em relação à produção de citocinas, como esperado, o estímulo com LPS determinou aumento significativo das três citocinas avaliadas: TNF- α , IL-6 e IL-10. O tratamento com rapamicina determinou queda significativa na produção de TNF- α (figura 4C) e IL-6 (figura 4D) e diminuição discreta na produção de IL-10 (figura 4E).

Avaliamos a seguir o efeito da rapamicina na polarização da microglia através da expressão de genes relacionados ao perfil M2 (TREM2 e ARG1) e de genes relacionados ao perfil M1 (iNOS, NF-kB). O tratamento com rapamicina induziu expressão significativamente maior de TREM2 (figura 5A) e expressão reduzida, apesar de não significativa, de ARG1, iNOS e NF-kB (figura 4B-D). Também foi avaliada a intensidade média de fluorescência (MFI) das moléculas de superfície MHC II, CD40 e CD86 (figura 5E). Como esperado e mostrado na figura 5 (F-H), o estímulo com LPS determinou aumento significativo nos níveis de expressão destas três moléculas. A adição de rapamicina nas culturas estimuladas com LPS determinou redução significativa na expressão das mesmas.

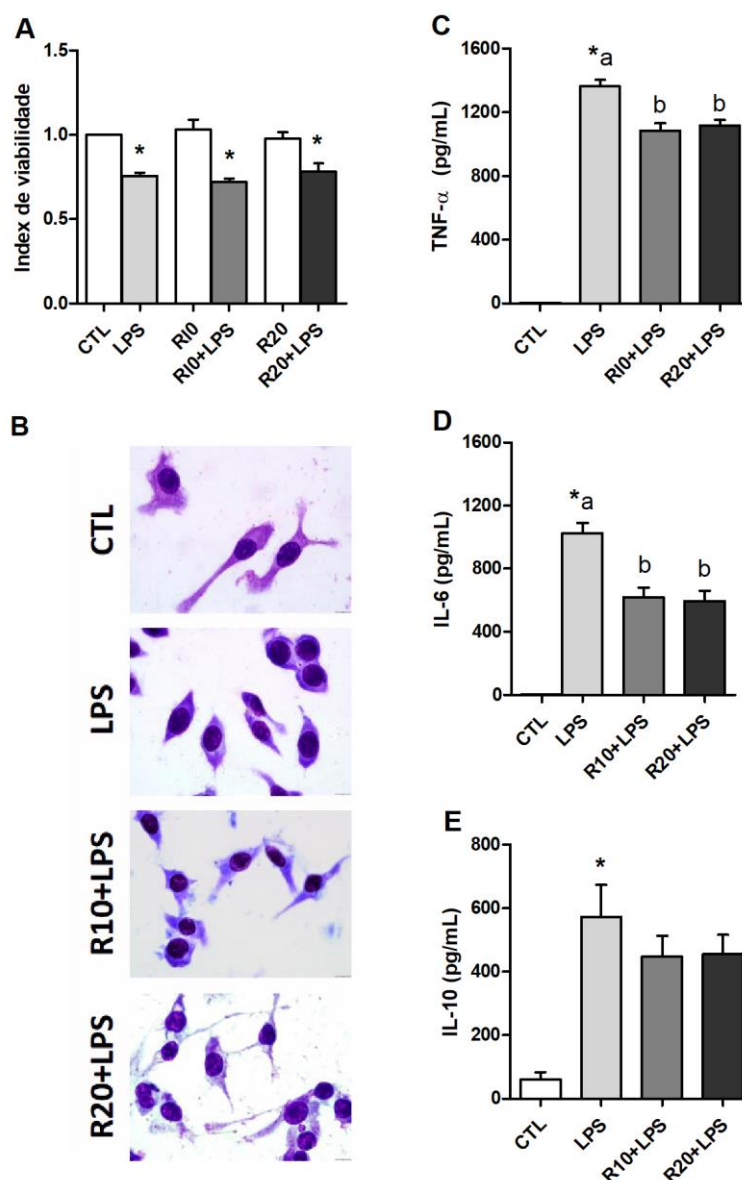


Figura 4. Efeito da rapamicina na atividade metabólica e na produção de citocinas por células da microglia. Cultura de células da linhagem BV-2 foi estimulada *in vitro* com LPS (100 ng/mL) na presença de rapamicina (10 e 20 nM). Após 24 horas de cultura (5×10^5 células/poço) foi avaliada a atividade mitocondrial pelo ensaio do MTT (A) e a morfologia pela coloração com Panótico (B) e foi realizada a dosagem de citocinas no sobrenadante: TNF- α (D), IL-6 (E) e IL-10 (F). Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média, $n=8$, representativo de 3 experimentos independentes. Teste t, sem estímulo vs com estímulo, *representa $p<0,05$; ANOVA com pós teste de Tukey, sem tratamento vs rapamicina 10nM vs rapamicina 20 nM, letras diferentes representam $p<0,05$.

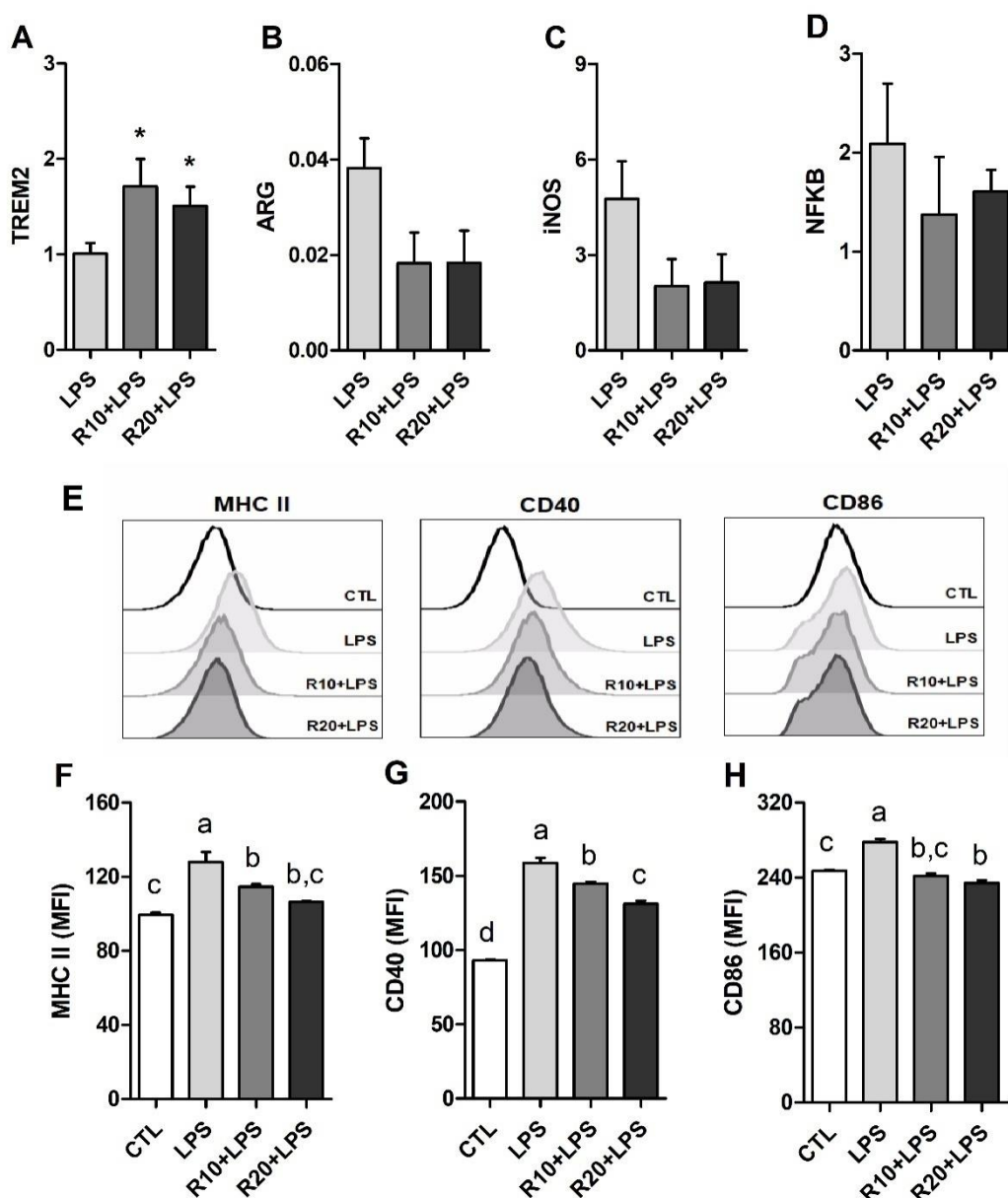


Figura 5. Efeito da rapamicina na polarização da microglia. Culturas de células da linhagem BV-2 foram estimuladas *in vitro* com LPS (100 ng/mL) na presença de rapamicina (10 e 20 nM). Após 24 horas de cultura (5×10^5 células/poço), as células foram utilizadas para avaliar a expressão de mRNA para: TREM2 (A), ARG1 (B), iNOS (C) e NF-κB (D), e imunofenotipadas por citometria de fluxo. Foram adquiridos 50 mil eventos e as células foram analisadas quanto à intensidade média de fluorescência (E) de MHC II (F), CD40 (G) e CD86 (H). Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média, $n=5-6$, representativo de 2 experimentos independentes. Teste t, sem estímulo vs com estímulo, *representa $p < 0,05$; ANOVA com pós teste de Tukey, sem tratamento vs rapamicina 10 nM vs rapamicina 20 nM, letras diferentes representam $p < 0,05$.

Discussão

A rapamicina foi inicialmente descoberta como um metabólito antifúngico produzido por *Streptomyces hygroscopicus* (LI; KIM; BLENIS, 2014). Entretanto posteriormente ficou demonstrado que também era dotada de atividade antiproliferativa e imunossupressora e, por isso, foi sugerida para o tratamento de pacientes transplantados para evitar rejeição (VÉZINA; KUDELSKI; SEHGAL, 1975) e de pacientes com determinadas neoplasias (MUKHOPADHYAY et al., 2016). Recentemente, tem sido sugerida a utilização da rapamicina para tratamento de doenças degenerativas, como Alzheimer, Parkinson, Huntington e atrofia espinocerebelar dominante (ASO; FERRER, 2013).

Uns poucos trabalhos têm indicado que a rapamicina é capaz de controlar o desenvolvimento da encefalomyelite autoimune experimental (EAE) em camundongos SJL (ESPOSITO et al., 2010) e C57BL/6 (HOU et al., 2017) e que podemos, portanto, considerá-la na terapia da esclerose múltipla (EM). Em apenas um estudo publicado foi testada a eficácia da rapamicina em pacientes com EM. Após 6 meses de tratamento com este medicamento, Bagherpour e colaboradores (BAGHERPOUR et al., 2018) observaram redução do tamanho das placas e aumento da expressão do FOXP3 nestes pacientes. Nesse contexto, o principal objetivo desta investigação foi caracterizar o potencial imunomodulador da rapamicina em células derivadas de um órgão linfóide secundário e também do sistema nervoso central (SNC). A linhagem de células da microglia, BV-2 foi usada para ensaios adicionais.

As células empregadas para testar o potencial imunomodulador da rapamicina foram retiradas de camundongos C57BL/6 com EAE, que desenvolveram uma patologia típica identificada pelo aparecimento de escores clínicos, pela perda de peso corporal e infiltração inflamatória e desmielinização no SNC. Foram realizados três experimentos independentes, sendo que as células foram obtidas na fase aguda da EAE, ou seja, 16 dias após indução da doença. Apesar de algumas diferenças, nos três experimentos o escore clínico mínimo atingido pelos animais foi 2 e apenas no experimento 2 os animais atingiram o escore clínico 4.

Utilizamos neste trabalho duas concentrações de rapamicina, 10 e 20 nM. Zheng e colaboradores (ZHENG; DING; JAHAN, 2014) mostraram que concentrações de rapamicina de 0, 1, 5, 10 e 20 nM apresentavam baixa toxicidade em culturas de células endoteliais de hemangioma de camundongo. Fletcher e colaboradores (FLETCHER et al., 2013) utilizando

10 e 20 nM de rapamicina relataram que o tratamento *in vitro* com rapamicina em modelo com acidente vascular encefálico (AVC), melhorou a viabilidade dos neurônios. O trabalho de Zhong e colaboradores (ZHONG et al., 2012), utilizando a dose de 10 nM de rapamicina na linhagem microglial BV-2, demonstrou que esta concentração de rapamicina não alterou a viabilidade destas células.

Inicialmente testamos e comparamos o efeito da adição de rapamicina em células esplênicas e em células derivadas do SNC, no que diz respeito à expressão dos fatores de transcrição das principais subpopulações de células T e à produção de citocinas. Este procedimento pretendia reproduzir o possível efeito *in vivo* da rapamicina tanto nas células reativas que ainda estavam no órgão linfóide secundário como também nas células reativas que já atingiram o SNC. Para tanto, adicionamos o estímulo específico peptídeo da glicoproteína da mielina de oligodendrócitos (MOG) e o imunossupressor (rapamicina) concomitantemente.

Contrariamente à nossa expectativa, o fator de transcrição TBX21, que propicia a produção da citocina inflamatória IFN- γ e a diferenciação de células Th1 (SZABO et al., 2000), não foi afetado pela rapamicina nem no baço nem nas células do SNC. Já em relação ao RORc, que é o fator de transcrição assinatura de células Th17 (CASTRO et al., 2017), constatamos que a rapamicina determinou modulação evidente em células do SNC mas não do baço. Este achado foi considerado altamente relevante porque as células Th17 desempenham um papel patogênico reconhecido em ambas, EAE e EM (MCGINLEY et al., 2018). Os resultados do tratamento experimental da encefalomielite com rapamicina sustentam este achado mostrando que este fármaco suprimiu a via de sinalização mTOR - STAT3 que é importante para a resposta Th17 (HOU et al., 2017).

O fato da rapamicina ter modulado o RORc no SNC mas não no baço, pode estar associado à cinética de migração das células durante o desenvolvimento da EAE, com maior acúmulo de células Th17 no SNC. O trabalho realizado por (MURPHY et al., 2010), descreveu a cinética de células T CD4⁺ secretoras de IFN- γ , de IL-17 ou de ambas as citocinas. No 14º dia após indução da EAE, os autores observaram maior percentual de células T CD4⁺ que secretam IFN- γ , mas não IL-17 (células Th1), no baço. Em contraste com a periferia, em amostras de cérebro os autores observaram maior percentual de células T CD4⁺ que secretam IL-17 (células Th17), IFN- γ (células Th1) ou ambas as citocinas (células Th1/Th17). Já em amostras de medula espinhal, a cinética é similar ao baço, com maior percentual de células T CD4⁺ que secretam IFN- γ , mas não IL-17 (células Th1).

O fator de transcrição Foxp3 é considerado crucial para a diferenciação de células T

reguladoras (LI et al., 2015). Está bem estabelecido que a capacidade da rapamicina em controlar o desenvolvimento de EAE se deve, pelo menos em parte, à expansão dessas células (ESPOSITO et al., 2010). No entanto, não encontramos aumento significativo na expressão do RNA mensageiro de Foxp3 em culturas de baço e de SNC. Este resultado foi atribuído à exigência de condições muito rigorosas para a expansão de Treg, que inclui níveis elevados de IL-2 (BATTAGLIA; STABILINI; RONCAROLO, 2005), como também requer longos períodos de incubação, populações de células purificadas e estímulos definidos como CD3/CD28 (HE et al., 2017).

A comparação entre a produção de citocinas em culturas de baço e em culturas do SNC indicou que as células derivadas do SNC eram mais fortemente moduladas pela rapamicina. Esse achado assemelha-se ao supracitado e relacionado aos fatores de transcrição. Portanto, é possível que a atividade da rapamicina dependa da origem celular, estado de ativação e talvez da quantidade de células específicas que estão sendo testadas. Neste sentido, tem fundamento acreditar que a proporção de células específicas para MOG no SNC de camundongos com EAE é muito maior do que no baço desses animais.

Considerando que a estimulação específica do TCR é um dos principais eventos que desencadeia a ativação do mTOR (HAMILTON et al., 2014; WAICKMAN; POWELL, 2012), podemos inferir que as células ativadas seriam os principais alvos desse fármaco. Além disso, resultados preliminares, não apresentados nesta dissertação, mostraram uma modulação significativa da rapamicina sobre células esplênicas oriundas de animais normais estimuladas com a concanavalina A (ConA), que é um ativador policlonal. Sendo assim, a capacidade imunomoduladora da rapamicina é provavelmente afetada pelo ambiente inflamatório, o que condiz com nossos achados.

No que diz respeito à produção de citocinas pelas células eluídas do SNC, a adição de rapamicina reduziu significativamente a produção de IFN- γ , IL-17 e TNF- α , enquanto a produção de IL-10, IL-6, IL-2 e TGF- β foi levemente reduzida. Este é um assunto complexo, mas, à luz da literatura, essa inibição pode ser atribuída a diferentes mecanismos como redução na apresentação de antígenos (THOMSON; TURNQUIST; RAIMONDI, 2009) e/ou regulação negativa dos fatores de transcrição de células T diretamente ou através do bloqueio do ciclo celular de T dependente de IL-2 (GONZALEZ MURCIA et al., 2013). Neste contexto, a inibição da IL-17 pode ser atribuída à inibição da expressão de RORc. Por outro lado, a produção de IFN- γ e TNF- α não parece estar relacionada à inibição de TBX21, estando possivelmente associado a outros mecanismos.

Considerando a literatura que associa a sensibilidade de mTORC1 e mTORC2 à

concentrações distintas de rapamicina (TOSCHI et al., 2009) e o fato do mTORC1 promover diferenciação Th1 e Th17 enquanto o mTORC2 medeia a polarização Th2 (DELGOFFE et al., 2011), acreditamos que o protocolo adotado neste trabalho favoreceu a via metabólica associada ao mTORC1.

A metodologia utilizada para isolamento de leucócitos do SNC possibilita a retirada de células mononucleares residentes (neurônios, astrócitos, oligodendrócitos, microglia), que não expressam ou apresentam baixa expressão de CD45, e células mononucleares infiltrantes (leucócitos), que apresentam elevada expressão de CD45 (PINO; CARDONA, 2011). Dentro da população CD45+, que inclui todos os leucócitos infiltrantes, está também a microglia, uma célula da resposta imune inata residente do SNC. Associando a molécula CD11b, um receptor de complemento 3 que é expresso em fagócitos, é possível distinguir a população de microglia (CD45^{Low}CD11b⁺) e macrófagos infiltrantes (CD45^{High}CD11b⁺) dos demais leucócitos presentes no SNC (MURPHY et al., 2010). Considerando que nossas culturas foram realizadas com células mononucleares totais, é possível que a rapamicina esteja afetando diretamente células da resposta imune inata, incluindo a microglia, o que poderia explicar a baixa produção de TNF- α sem a modulação de células Th1.

Como a microglia desempenha um papel fundamental nos distúrbios neurológicos, sendo capaz de promover tanto a progressão da doença quanto a homeostase do SNC (DU et al., 2017; SZEPESI et al., 2018), dependendo de seu perfil de ativação, testamos sua suscetibilidade à imunomodulação pela rapamicina. Também consideramos o fato de que evidências experimentais indicam o envolvimento do mTOR na ativação pró-inflamatória da microglia (DELLO RUSSO et al., 2009). Sendo assim, na etapa final deste projeto investigamos o efeito da rapamicina em uma linhagem microglial conhecida como BV-2. Esta linhagem é considerada um substituto válido para realizar diferentes investigações no sentido de subsidiar os resultados encontrados em culturas primárias (HENN et al., 2009).

Iniciamos esta etapa analisando a atividade metabólica de células BV-2 após 24 horas de contato com rapamicina. As duas concentrações testadas não determinaram efeito citotóxico sobre as células quando adicionadas sozinhas. No entanto, a adição do LPS alterou a atividade metabólica destas células e a rapamicina não reverteu este processo. Outro achado interessante é a diminuição de projeções citoplasmáticas observadas nas culturas estimuladas com LPS. Ao serem estimuladas, seja por estímulos patológicos ou fisiológicos, a microglia ativada perde as longas extensões típicas da fase de repouso e passa a apresentar extensões ameboides e começa a produzir uma série de fatores que são estímulo-dependentes (LUO; CHEN, 2012). Este achado foi o primeiro indício de que a rapamicina poderia modular a

microglia.

Para avaliar a ativação da microglia, analisamos também a produção de citocinas em sobrenadante de cultura. Similarmente a outros relatos da literatura, a adição de rapamicina nas células BV-2 estimuladas com LPS reduziu a produção de citocinas pró-inflamatórias (HAN et al., 2013; YE et al., 2017). Essa inibição tem sido associada à ativação da autofagia (BUSSI et al., 2017; YE et al., 2017) e isso é relevante porque a perda da função autofágica no SNC tem sido associada com doenças neurodegenerativas (PLAZA-ZABALA; SIERRA-TORRE; SIERRA, 2017). Para concluir esta investigação, testamos se a rapamicina seria capaz de reprogramar a microglia com um fenótipo M1 para um fenótipo M2. A definição de vários estados de ativação dos macrófagos está bem estabelecida pela literatura. Comparando com macrófagos periféricos, a microglia tem características semelhantes mas também únicas no que diz respeito à polarização de fenótipos. O interesse em compreender a modulação e polarização de fenótipos da microglia reside no fato de ser esta uma alternativa terapêutica com potencial para o tratamento de doenças neurodegenerativas que afetam milhares de pessoas no mundo inteiro (CHERRY; OLSCHOWKA; O'BANION, 2014).

Historicamente, classifica-se a resposta (ativação) sofrida por essas células em clássica e alternativa. A ativação clássica (M1) corresponde ao fenótipo pró-inflamatório/tóxico, caracterizada pela liberação de iNOS (induciblenitric oxide synthase), citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-1 β e radicais livres (MI et al., 2018). Por outro lado, o fenótipo anti-inflamatório/protetor é voltado para a reparação tecidual, é representado pela ativação alternativa (M2), na qual há aumento de expressão de ARG-1 (arginase 1), produção de citocinas anti-inflamatórias e expressão de alguns receptores, como por exemplo o TREM2 (*Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2*). TREM2 é um receptor que pertence à família TREM expresso em macrófagos ativados, células dendríticas imaturas, osteoclastos e principalmente na microglia, fazendo parte da resposta imune inata (COLONNA, 2003; FORD; MCVICAR, 2009). Este desempenha algumas funções importantes na vigilância imunológica, incluindo interações célula-célula e retirada de detritos teciduais (TAKAHASHI; ROCHFORD; NEUMANN, 2005).

No presente estudo, observamos uma modulação negativa da expressão de mRNA iNOS e uma regulação positiva de mRNA TREM2. Essas alterações têm sido consistentemente associadas a uma polarização da microglia para um fenótipo M2, promovida pela expressão de TREM2, um fator importante na troca dos fenótipos da microglia (JIANG et al., 2016; MACHADO-PEREIRA et al., 2017; ZHENG et al., 2018). Estes marcadores de ativação microglial são úteis em estudos principalmente em doenças neurodegenerativas nas

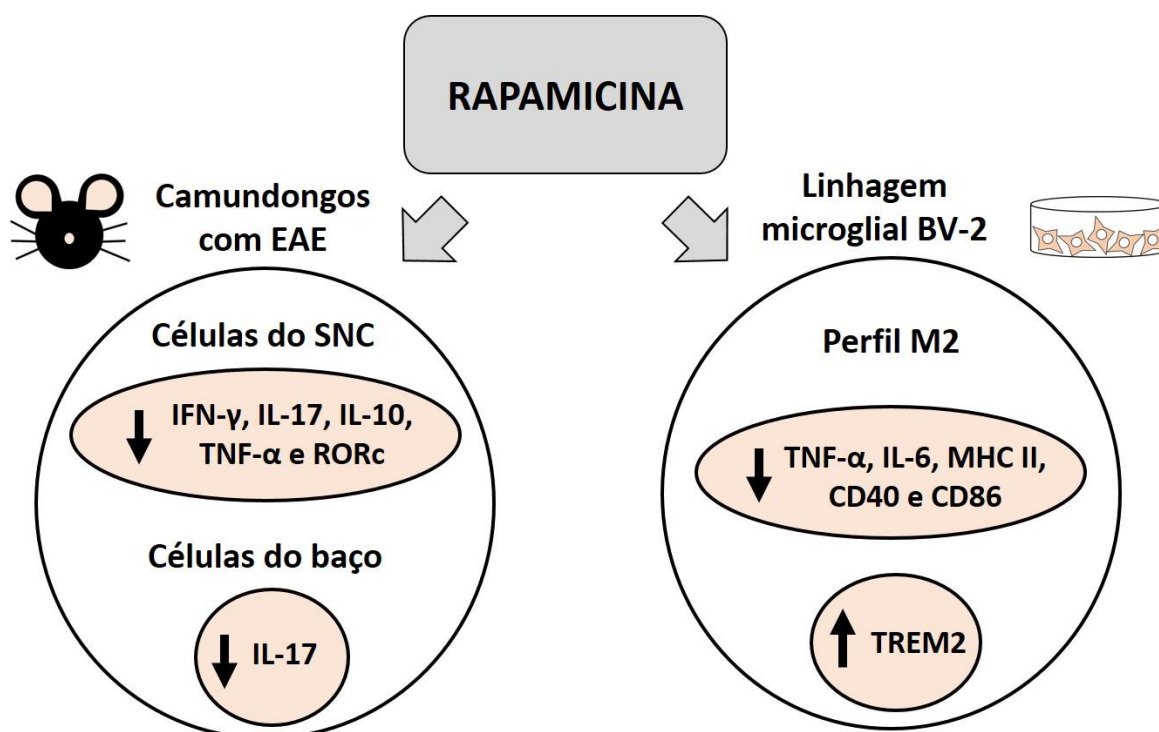
quais fica evidenciada a ativação dessas células (FRANK-CANNON et al., 2009).

O efeito da rapamicina sobre as células da microglia foi ainda mais acentuado em relação à expressão de moléculas envolvidas na apresentação de antígenos (MHCII, CD40 e CD86). Observamos uma diminuição significativa destes marcadores, o que aponta claramente para a capacidade da rapamicina de diminuir o potencial dessas células em apresentar antígenos no SNC. Além da apresentação de antígenos, as interações entre CD40-CD40L foram relatadas como importantes na patogênese da EAE (CHITNIS; KHOURY, 2003), sendo que a não expressão de CD40 ou CD40L pode bloquear o desenvolvimento da doença (CHITNIS; KHOURY, 2003).

Considerações finais

Nesta investigação demonstramos que a rapamicina pode atuar *in vitro* tanto na periferia quanto no SNC e que este fármaco interfere em vários níveis incluindo a síntese e expressão de fatores de transcrição e também a expressão de moléculas envolvidas nos processos de ativação de linfócitos T. Em resumo, ilustrado na figura abaixo, estes resultados indicam que o potencial imunomodulador da rapamicina foi, em muitos aspectos, confirmado pela utilização de ensaios *ex vivo* e *in vitro* com células derivadas de camundongos com EAE e com linhagem microglial (BV-2), respectivamente.

Portanto, propomos que outras moléculas candidatas à terapia de EM sejam inicialmente rastreadas usando essa abordagem. Esta alternativa experimental não tem sido explorada de forma evidente mas constitui, em nossa opinião, uma possibilidade que oferece algumas vantagens. Neste sentido ressaltamos o uso de um número significativamente menor de animais e o barateamento da investigação uma vez que, no caso especial da EAE, a indução da doença é bastante dispendiosa.



Referências

- AKTAS, O.; KÜRY, P.; KIESEIER, B.; HARTUNG, H.-P. Fingolimod is a potential novel therapy for multiple sclerosis. **Nature reviews. Neurology**, [s. l.], v. 6, n. 7, p. 373–82, 2010.
- ALMOLDA, B.; GONZÁLEZ, B.; CASTELLANO, B. Activated microglial cells acquire an immature dendritic cell phenotype and may terminate the immune response in an acute model of EAE. **Journal of neuroimmunology**, [s. l.], v. 223, n. 1–2, p. 39–54, 2010.
- ALONSO, A.; HERNÁN, M. A. Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis: a systematic review. **Neurology**, [s. l.], v. 71, n. 2, p. 129–35, 2008.
- ASCHERIO, A.; MUNGER, K. L.; LÜNEMANN, J. D. The initiation and prevention of multiple sclerosis. **Nature reviews. Neurology**, [s. l.], v. 8, n. 11, p. 602–12, 2012.
- ASO, E.; FERRER, I. It may be possible to delay the onset of neurodegenerative diseases with an immunosuppressive drug (rapamycin). **Expert opinion on biological therapy**, [s. l.], v. 13, n. 9, p. 1215–9, 2013.
- AWASTHI, A.; MURUGAIYAN, G.; KUCHROO, V. K. Interplay between effector Th17 and regulatory T cells. **Journal of clinical immunology**, [s. l.], v. 28, n. 6, p. 660–70, 2008.
- BAGHERPOUR, B.; SALEHI, M.; JAFARI, R.; BAGHERI, A.; KIANI-ESFAHANI, A.; EDALATI, M.; KARDI, M. T.; SHAYGANNEJAD, V. Promising effect of rapamycin on multiple sclerosis. **Multiple sclerosis and related disorders**, [s. l.], v. 26, p. 40–45, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30219744>>
- BATTAGLIA, M.; STABILINI, A.; RONCAROLO, M.-G. Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. **Blood**, [s. l.], v. 105, n. 12, p. 4743–8, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15746082>>
- BENJAMIN, D.; COLOMBI, M.; MORONI, C.; HALL, M. N. Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors. **Nature reviews. Drug discovery**, [s. l.], v. 10, n. 11, p. 868–80, 2011.
- BERNARD, C. C.; JOHNS, T. G.; SLAVIN, A.; ICHIKAWA, M.; EWING, C.; LIU, J.; BETTADAPURA, J. Myelin oligodendrocyte glycoprotein: a novel candidate autoantigen in multiple sclerosis. **Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)**, [s. l.], v. 75, n. 2, p. 77–88, 1997.
- BHASIN, M.; WU, M.; TSIRKA, S. E. Modulation of microglial/macrophage activation by macrophage inhibitory factor (TKP) or tuftsin (TKPR) attenuates the disease course of experimental autoimmune encephalomyelitis. **BMC immunology**, [s. l.], v. 8, p. 10, 2007.
- BLASI, E.; BARLUZZI, R.; BOCCHINI, V.; MAZZOLLA, R.; BISTONI, F. Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. **Journal of neuroimmunology**, [s. l.], v. 27, n. 2–3, p. 229–37, 1990.
- BROWNE, P.; CHANDRARATNA, D.; ANGOOD, C.; TREMLETT, H.; BAKER, C.; TAYLOR, B. V.; THOMPSON, A. J. Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity. **Neurology**, [s. l.], v. 83, n. 11, p. 1022–4, 2014.
- BUSSI, C.; PERALTA RAMOS, J. M.; ARROYO, D. S.; GAVIGLIO, E. A.; GALLEA, J. I.; WANG, J. M.; CELEJ, M. S.; IRIBARREN, P. Autophagy down regulates pro-inflammatory mediators in BV2 microglial cells and rescues both LPS and alpha-synuclein induced neuronal cell death. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 43153, 2017.
- CASTRO, G.; LIU, X.; NGO, K.; DE LEON-TABALDO, A.; ZHAO, S.; LUNA-ROMAN, R.; YU, J.; CAO, T.; KUHN, R.; WILKINSON, P.; HERMAN, K.; NELEN, M. I.; BLEVITT, J.; XUE, X.; FOURIE, A.; FUNG-LEUNG, W.-P. ROR γ t and ROR α signature genes in human Th17 cells. **PloS one**, [s. l.], v. 12, n. 8, p. e0181868, 2017.
- CHERRY, J. D.; OLSCHOWKA, J. A.; O'BANION, M. Neuroinflammation and M2

- microglia: the good, the bad, and the inflamed. **Journal of Neuroinflammation**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 98, 2014.
- CHITNIS, T.; KHOURY, S. J. Role of costimulatory pathways in the pathogenesis of multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. **The Journal of allergy and clinical immunology**, [s. l.], v. 112, n. 5, p. 837–49; quiz 850, 2003.
- COLONNA, M. TREMs in the immune system and beyond. **Nature reviews. Immunology**, [s. l.], v. 3, n. 6, p. 445–53, 2003.
- COMMITTEE FOR MEDICINAL PRODUCTS FOR HUMAN USE (CHMP). **Rapamune: International non-proprietary name: sirolimus**, European Medicines Agency, 2018.
- COMPSTON, A. The pathogenesis and basis for treatment in multiple sclerosis. **Clinical neurology and neurosurgery**, [s. l.], v. 106, n. 3, p. 246–8, 2004.
- CORRADIN, S. B.; MAUËL, J.; DONINI, S. D.; QUATTROCCHI, E.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. Inducible nitric oxide synthase activity of cloned murine microglial cells. **Glia**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 255–62, 1993.
- CRINO, P. B. The mTOR signalling cascade: paving new roads to cure neurological disease. **Nature reviews. Neurology**, [s. l.], v. 12, n. 7, p. 379–92, 2016.
- CROXFORD, A. L.; KURSCHUS, F. C.; WAISMAN, A. Mouse models for multiple sclerosis: historical facts and future implications. **Biochimica et biophysica acta**, [s. l.], v. 1812, n. 2, p. 177–83, 2011.
- DAI, Z.-J.; GAO, J.; MA, X.-B.; KANG, H.-F.; WANG, B.-F.; LU, W.-F.; LIN, S.; WANG, X.-J.; WU, W.-Y. Antitumor effects of rapamycin in pancreatic cancer cells by inducing apoptosis and autophagy. **International journal of molecular sciences**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 273–85, 2012.
- 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 : targets & therapy**, [s. l.], v. 7, p. 247–58, 2013.
- DELGOFFE, G. M.; POLLIZZI, K. N.; WAICKMAN, A. T.; HEIKAMP, E.; MEYERS, D. J.; HORTON, M. R.; XIAO, B.; WORLEY, P. F.; POWELL, J. D. The kinase mTOR regulates the differentiation of helper T cells through the selective activation of signaling by mTORC1 and mTORC2. **Nature immunology**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 295–303, 2011.
- DELLO RUSSO, C.; LISI, L.; TRINGALI, G.; NAVARRA, P. Involvement of mTOR kinase in cytokine-dependent microglial activation and cell proliferation. **Biochemical pharmacology**, [s. l.], v. 78, n. 9, p. 1242–51, 2009.
- DENDROU, C. A.; FUGGER, L.; FRIESE, M. A. Immunopathology of multiple sclerosis. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 15, n. 9, p. 545–558, 2015.
- DU, L.; ZHANG, Y.; CHEN, Y.; ZHU, J.; YANG, Y.; ZHANG, H.-L. Role of Microglia in Neurological Disorders and Their Potentials as a Therapeutic Target. **Molecular neurobiology**, [s. l.], v. 54, n. 10, p. 7567–7584, 2017.
- ESPOSITO, M.; RUFFINI, F.; BELLONE, M.; GAGLIANI, N.; BATTAGLIA, M.; MARTINO, G.; FURLAN, R. Rapamycin inhibits relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis by both effector and regulatory T cells modulation. **Journal of neuroimmunology**, [s. l.], v. 220, n. 1–2, p. 52–63, 2010.
- FLETCHER, J. M.; LALOR, S. J.; SWEENEY, C. M.; TUBRIDY, N.; MILLS, K. H. G. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. **Clinical and experimental immunology**, [s. l.], v. 162, n. 1, p. 1–11, 2010.
- FLETCHER, L.; EVANS, T. M.; WATTS, L. T.; JIMENEZ, D. F.; DIGICAYLIOGLU, M. Rapamycin Treatment Improves Neuron Viability in an In Vitro Model of Stroke. [s. l.], v. 8, n. 7, 2013.
- FORD, J. W.; MCVICAR, D. W. TREM and TREM-like receptors in inflammation and disease. **Current opinion in immunology**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 38–46, 2009.

- FRAGOSO, Y. D.; PERES, M. Prevalence of multiple sclerosis in the city of Santos , SP
Prevalência de esclerose múltipla na cidade de Santos , SP. [s. l.], v. 10, n. 4, p. 479–482, 2007.
- FRANK-CANNON, T. C.; ALTO, L. T.; MCALPINE, F. E.; TANSEY, M. G. Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases? **Molecular neurodegeneration**, [s. l.], v. 4, p. 47, 2009.
- FREEMAN, L. C.; TING, J. P.-Y. The pathogenic role of the inflammasome in neurodegenerative diseases. **Journal of neurochemistry**, [s. l.], v. 136 Suppl, p. 29–38, 2016.
- GANDHI, R.; LARONI, A.; WEINER, H. L. Role of the innate immune system in the pathogenesis of multiple sclerosis. **Journal of neuroimmunology**, [s. l.], v. 221, n. 1–2, p. 7–14, 2010.
- GEISLER, E. K. Post-transplantation malignancies: here today, gone tomorrow? **Nature reviews. Clinical oncology**, [s. l.], v. 12, n. 12, p. 705–17, 2015.
- GHASEMI, N.; RAZAVI, S.; NIKZAD, E. Multiple Sclerosis: Pathogenesis, Symptoms, Diagnoses and Cell-Based Therapy. **Cell journal**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 1–10, 2017.
- GINHOUX, F.; GUILLIAMS, M. Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. **Immunity**, [s. l.], v. 44, n. 3, p. 439–449, 2016.
- GIULIAN, D.; BAKER, T. J. Characterization of ameboid microglia isolated from developing mammalian brain. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, [s. l.], v. 6, n. 8, p. 2163–78, 1986.
- GIUNTI, D.; PARODI, B.; CORDANO, C.; UCCELLI, A.; KERLERO DE ROSBO, N. Can we switch microglia's phenotype to foster neuroprotection? Focus on multiple sclerosis. **Immunology**, [s. l.], v. 141, n. 3, p. 328–39, 2014.
- GLICK, D.; BARTH, S.; MACLEOD, K. F. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. **The Journal of pathology**, [s. l.], v. 221, n. 1, p. 3–12, 2010.
- GOLD, R.; LININGTON, C.; LASSMANN, H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. **Brain : a journal of neurology**, [s. l.], v. 129, n. Pt 8, p. 1953–71, 2006.
- GOLD, R.; WOLINSKY, J. S. Pathophysiology of multiple sclerosis and the place of teriflunomide. **Acta neurologica Scandinavica**, [s. l.], v. 124, n. 2, p. 75–84, 2011.
- GONZALEZ MURCIA, J. D.; SCHMUTZ, C.; MUNGER, C.; PERKES, A.; GUSTIN, A.; PETERSON, M.; EBBERT, M. T. W.; NORTON, M. C.; TSCHANZ, J. T.; MUNGER, R. G.; CORCORAN, C. D.; KAUWE, J. S. K. Assessment of TREM2 rs75932628 association with Alzheimer's disease in a population-based sample: the Cache County Study. **Neurobiology of aging**, [s. l.], v. 34, n. 12, p. 2889.e11-3, 2013.
- HAMILTON, K. S.; PHONG, B.; COREY, C.; CHENG, J.; GORENTLA, B.; ZHONG, X.; SHIVA, S.; KANE, L. P. T cell receptor-dependent activation of mTOR signaling in T cells is mediated by Carma1 and MALT1, but not Bcl10. **Science signaling**, [s. l.], v. 7, n. 329, p. ra55, 2014.
- HAN, H.-E.; KIM, T.-K.; SON, H.-J.; PARK, W. J.; HAN, P.-L. Activation of Autophagy Pathway Suppresses the Expression of iNOS, IL6 and Cell Death of LPS-Stimulated Microglia Cells. **Biomolecules & therapeutics**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 21–8, 2013.
- HE, S.; ZHANG, Y.; WANG, D.; TAO, K.; ZHANG, S.; WEI, L.; CHEN, Q. Rapamycin/GABA combination treatment ameliorates diabetes in NOD mice. **Molecular immunology**, [s. l.], v. 73, p. 130–7, 2016.
- HE, X.; SMEETS, R. L.; VAN RIJSEN, E.; BOOTS, A. M. H.; JOOSTEN, I.; KOENEN, H. J. P. M. Single CD28 stimulation induces stable and polyclonal expansion of human regulatory T cells. **Scientific reports**, [s. l.], v. 7, p. 43003, 2017.
- HEMMER, B.; KERSCHENSTEINER, M.; KORN, T. Role of the innate and adaptive

- immune responses in the course of multiple sclerosis. **The Lancet. Neurology**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 406–19, 2015.
- HENN, A.; LUND, S.; HEDTJÄRN, M.; SCHRATTENHOLZ, A.; PÖRZGEN, P.; LEIST, M. The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation. **ALTEX**, [s. l.], v. 26, n. 2, p. 83–94, 2009.
- HEPPNER, F. L.; GRETER, M.; MARINO, D.; FALSIG, J.; RAIVICH, G.; HÖVELMEYER, N.; WAISMAN, A.; RÜLICHE, T.; PRINZ, M.; PRILLER, J.; BECHER, B.; AGUZZI, A. Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis. **Nature medicine**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 146–52, 2005.
- HERNÁNDEZ-PEDRO, N. Y.; ESPINOSA-RAMIREZ, G.; DE LA CRUZ, V. P.; PINEDA, B.; SOTELO, J. Initial immunopathogenesis of multiple sclerosis: innate immune response. **Clinical & developmental immunology**, [s. l.], v. 2013, p. 413465, 2013.
- HOU, H.; MIAO, J.; CAO, R.; HAN, M.; SUN, Y.; LIU, X.; GUO, L. Rapamycin Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Suppressing the mTOR-STAT3 Pathway. **Neurochemical research**, [s. l.], v. 42, n. 10, p. 2831–2840, 2017.
- HUPPERT, J.; CLOSHEN, D.; CROXFORD, A.; WHITE, R.; KULIG, P.; PIETROWSKI, E.; BECHMANN, I.; BECHER, B.; LUHMANN, H. J.; WAISMAN, A.; KUHLMANN, C. R. W. Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, [s. l.], v. 24, n. 4, p. 1023–34, 2010.
- JIANG, T.; TAN, L.; CHEN, Q.; TAN, M.-S.; ZHOU, J.-S.; ZHU, X.-C.; LU, H.; WANG, H.-F.; ZHANG, Y.-D.; YU, J.-T. A rare coding variant in TREM2 increases risk for Alzheimer's disease in Han Chinese. **Neurobiology of aging**, [s. l.], v. 42, p. 217.e1-3, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27067662>>
- JIN, H.-G.; WU, G.-Z.; WU, G.-H.; BAO, Y.-G. Combining the mammalian target of rapamycin inhibitor, rapamycin, with resveratrol has a synergistic effect in multiple myeloma. **Oncology letters**, [s. l.], v. 15, n. 5, p. 6257–6264, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29731844>>
- KAPPOS, L.; RADUE, E.-W.; O'CONNOR, P.; POLMAN, C.; HOHLFELD, R.; CALABRESI, P.; SELMAJ, K.; AGOROPOULOU, C.; LEYK, M.; ZHANG-AUBERSON, L.; BURTIN, P.; FREEDOMS STUDY GROUP. A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. **The New England journal of medicine**, [s. l.], v. 362, n. 5, p. 387–401, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20089952>>
- KATHOLNIG, K.; LINKE, M.; PHAM, H.; HENGSTSCHLÄGER, M.; WEICHHART, T. Immune responses of macrophages and dendritic cells regulated by mTOR signalling. **Biochemical Society transactions**, [s. l.], v. 41, n. 4, p. 927–33, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23863158>>
- KIERDORF, K.; ERNY, D.; GOLDMANN, T.; SANDER, V.; SCHULZ, C.; PERDIGUERO, E. G.; WIEGHOFER, P.; HEINRICH, A.; RIEMKE, P.; HÖLSCHER, C.; MÜLLER, D. N.; LUCKOW, B.; BROCKER, T.; DEBOWSKI, K.; FRITZ, G.; OPDENAKKER, G.; DIEFENBACH, A.; BIBER, K.; HEIKENWALDER, M.; GEISSMANN, F.; ROSENBAUER, F.; PRINZ, M. Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. **Nature neuroscience**, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 273–80, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23334579>>
- KLINKERT, W. E.; KOJIMA, K.; LESSLAUER, W.; RINNER, W.; LASSMANN, H.; WEKERLE, H. TNF-alpha receptor fusion protein prevents experimental auto-immune encephalomyelitis and demyelination in Lewis rats: an overview. **Journal of neuroimmunology**, [s. l.], v. 72, n. 2, p. 163–8, 1997.

- KOMIYAMA, Y.; NAKAE, S.; MATSUKI, T.; NAMBU, A.; ISHIGAME, H.; KAKUTA, S.; SUDO, K.; IWAKURA, Y. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, [s. l.], v. 177, n. 1, p. 566–73, 2006.
- LI, J.; KIM, S. G.; BLENIS, J. Rapamycin: one drug, many effects. **Cell metabolism**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 373–9, 2014.
- LI, Z.; LI, D.; TSUN, A.; LI, B. FOXP3⁺ regulatory T cells and their functional regulation. **Cellular & molecular immunology**, [s. l.], v. 12, n. 5, p. 558–65, 2015.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 402–8, 2001.
- LODYGIN, D.; FLÜGEL, A. Intravital real-time analysis of T cell activation in health and disease. **Cell Calcium**, [s. l.], 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ceca.2016.12.007>>
- LUBETZKI, C.; STANKOFF, B. Demyelination in multiple sclerosis. In: [s.l: s.n.]. p. 89–99.
- LULL, M. E.; BLOCK, M. L. Microglial activation and chronic neurodegeneration. **Neurotherapeutics: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 354–65, 2010.
- LUO, C.; JIAN, C.; LIAO, Y.; HUANG, Q.; WU, Y.; LIU, X.; ZOU, D.; WU, Y. The role of microglia in multiple sclerosis. **Neuropsychiatric disease and treatment**, [s. l.], v. 13, p. 1661–1667, 2017.
- LUO, X.-G.; CHEN, S.-D. The changing phenotype of microglia from homeostasis to disease. **Translational neurodegeneration**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 9, 2012.
- MACHADO-PEREIRA, M.; SANTOS, T.; FERREIRA, L.; BERNARDINO, L.; FERREIRA, R. Anti-Inflammatory Strategy for M2 Microglial Polarization Using Retinoic Acid-Loaded Nanoparticles. **Mediators of Inflammation**, [s. l.], v. 2017, p. 1–11, 2017.
- MARRIE, R. A. Environmental risk factors in multiple sclerosis aetiology. **The Lancet. Neurology**, [s. l.], v. 3, n. 12, p. 709–18, 2004.
- MCGINLEY, A. M.; EDWARDS, S. C.; RAVERDEAU, M.; MILLS, K. H. G. Th17 cells, $\gamma\delta$ T cells and their interplay in EAE and multiple sclerosis. **Journal of autoimmunity**, [s. l.], 2018.
- MCMURRAN, C. E.; JONES, C. A.; FITZGERALD, D. C.; FRANKLIN, R. J. M. CNS Remyelination and the Innate Immune System. **Frontiers in cell and developmental biology**, [s. l.], v. 4, p. 38, 2016.
- MI, Y.; WU, Q.; YUAN, W.; CHEN, F.; DU, D. Role of microglia M1/M2 polarisation in the paraventricular nucleus: New insight into the development of stress-induced hypertension in rats. **Autonomic neuroscience : basic & clinical**, [s. l.], v. 213, p. 71–80, 2018.
- MIX, E.; MEYER-RIENECKER, H.; HARTUNG, H.-P.; ZETTL, U. K. Animal models of multiple sclerosis--potentials and limitations. **Progress in neurobiology**, [s. l.], v. 92, n. 3, p. 386–404, 2010.
- MUKHOPADHYAY, S.; FRIAS, M. A.; CHATTERJEE, A.; YELLEN, P.; FOSTER, D. A. The Enigma of Rapamycin Dosage. **Molecular cancer therapeutics**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 347–53, 2016.
- MURPHY, A. C.; LALOR, S. J.; LYNCH, M. A.; MILLS, K. H. G. Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Brain, behavior, and immunity**, [s. l.], v. 24, n. 4, p. 641–51, 2010.
- O'CONNOR, A. B.; SCHWID, S. R.; HERRMANN, D. N.; MARKMAN, J. D.; DWORKIN, R. H. Pain associated with multiple sclerosis: systematic review and proposed classification. **Pain**, [s. l.], v. 137, n. 1, p. 96–111, 2008.

- OSORIO-QUEREJETA, I.; SÁENZ-CUESTA, M.; MUÑOZ-CULLA, M.; OTAEGUI, D. Models for Studying Myelination, Demyelination and Remyelination. **Neuromolecular medicine**, [s. l.], v. 19, n. 2–3, p. 181–192, 2017.
- PIERROT-DESEILLIGNY, C.; SOUBERBIELLE, J.-C. Is hypovitaminosis D one of the environmental risk factors for multiple sclerosis? **Brain : a journal of neurology**, [s. l.], v. 133, n. Pt 7, p. 1869–88, 2010.
- PINO, P. A.; CARDONA, A. E. Isolation of brain and spinal cord mononuclear cells using percoll gradients. **Journal of visualized experiments : JoVE**, [s. l.], n. 48, 2011.
- PLAZA-ZABALA, A.; SIERRA-TORRE, V.; SIERRA, A. Autophagy and Microglia: Novel Partners in Neurodegeneration and Aging. **International journal of molecular sciences**, [s. l.], v. 18, n. 3, 2017.
- POLMAN, C. H.; O'CONNOR, P. W.; HAVRDOVA, E.; HUTCHINSON, M.; KAPPOS, L.; MILLER, D. H.; PHILLIPS, J. T.; LUBLIN, F. D.; GIOVANNONI, G.; WAJGT, A.; TOAL, M.; LYNN, F.; PANZARA, M. A.; SANDROCK, A. W. A Randomized, Placebo-Controlled Trial of Natalizumab for Relapsing Multiple Sclerosis. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 354, n. 9, p. 899–910, 2006.
- PREVEL, N.; ALLENBACH, Y.; KLATZMANN, D.; SALOMON, B.; BENVENISTE, O. Beneficial role of rapamycin in experimental autoimmune myositis. **PloS one**, [s. l.], v. 8, n. 11, p. e74450, 2013.
- RAI, Y.; PATHAK, R.; KUMARI, N.; SAH, D. K.; PANDEY, S.; KALRA, N.; SONI, R.; DWARAKANATH, B. S.; BHATT, A. N. Mitochondrial biogenesis and metabolic hyperactivation limits the application of MTT assay in the estimation of radiation induced growth inhibition. **Scientific reports**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1531, 2018.
- RUDICK, R. A. Esclerose Múltipla e patologias desmielinizantes do sistema nervoso central. In: ELSEVIER (Ed.). **Tratado de Medicina Interna**. Rio de Janeiro. p. 2713–2721.
- SAUNDERS, R. N.; METCALFE, M. S.; NICHOLSON, M. L. Rapamycin in transplantation: a review of the evidence. **Kidney international**, [s. l.], v. 59, n. 1, p. 3–16, 2001.
- SAXTON, R. A.; SABATINI, D. M. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. **Cell**, [s. l.], v. 168, n. 6, p. 960–976, 2017.
- SCHMIDT, H.; WILLIAMSON, D.; ASHLEY-KOCH, A. HLA-DR15 haplotype and multiple sclerosis: a HuGE review. **American journal of epidemiology**, [s. l.], v. 165, n. 10, p. 1097–109, 2007.
- SCHULZ, M.; ENGELHARDT, B. The circumventricular organs participate in the immunopathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Cerebrospinal fluid research**, [s. l.], v. 2, p. 8, 2005.
- SLOWIK, A.; SCHMIDT, T.; BEYER, C.; AMOR, S.; CLARNER, T.; KIPP, M. The sphingosine 1-phosphate receptor agonist FTY720 is neuroprotective after cuprizone-induced CNS demyelination. **British journal of pharmacology**, [s. l.], v. 172, n. 1, p. 80–92, 2015.
- SUN, D.; NEWMAN, T. A.; PERRY, V. H.; WELLER, R. O. Cytokine-induced enhancement of autoimmune inflammation in the brain and spinal cord: implications for multiple sclerosis. **Neuropathology and applied neurobiology**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 374–84, 2004.
- SUNEETHA, A.; RAJA RAJESWARI, K. Role of dimethyl fumarate in oxidative stress of multiple sclerosis: A review. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, [s. l.], v. 1019, p. 15–20, 2016.
- SZABO, S. J.; KIM, S. T.; COSTA, G. L.; ZHANG, X.; FATHMAN, C. G.; GLIMCHER, L. H. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. **Cell**, [s. l.], v. 100, n. 6, p. 655–69, 2000.
- SZEPESI, Z.; MANOUCHEHRAN, O.; BACHILLER, S.; DEIERBORG, T. Bidirectional Microglia-Neuron Communication in Health and Disease. **Frontiers in cellular**

neuroscience, [s. l.], v. 12, p. 323, 2018.

TAKAHASHI, K.; ROCHFORD, C. D. P.; NEUMANN, H. Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2. **The Journal of experimental medicine**, [s. l.], v. 201, n. 4, p. 647–57, 2005.

TAKEI, N.; NAWA, H. mTOR signaling and its roles in normal and abnormal brain development. **Frontiers in molecular neuroscience**, [s. l.], v. 7, p. 28, 2014.

TEACHEY, D. T.; OBZUT, D. A.; AXSOM, K.; CHOI, J. K.; GOLDSMITH, K. C.; HALL, J.; HULITT, J.; MANNO, C. S.; MARIS, J. M.; RHODIN, N.; SULLIVAN, K. E.; BROWN, V. I.; GRUPP, S. A. Rapamycin improves lymphoproliferative disease in murine autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS). **Blood**, [s. l.], v. 108, n. 6, p. 1965–71, 2006.

TEE, A. R. The Target of Rapamycin and Mechanisms of Cell Growth. **International journal of molecular sciences**, [s. l.], v. 19, n. 3, 2018.

THOMSON, A. W.; TURNQUIST, H. R.; RAIMONDI, G. Immunoregulatory functions of mTOR inhibition. **Nature reviews. Immunology**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. 324–37, 2009.

TONG, M.; JIANG, Y. FK506-Binding Proteins and Their Diverse Functions. **Current molecular pharmacology**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 48–65, 2015.

TOSCHI, A.; LEE, E.; XU, L.; GARCIA, A.; GADIR, N.; FOSTER, D. A. Regulation of mTORC1 and mTORC2 complex assembly by phosphatidic acid: competition with rapamycin. **Molecular and cellular biology**, [s. l.], v. 29, n. 6, p. 1411–20, 2009.

VÉZINA, C.; KUDELSKI, A.; SEHGAL, S. N. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. **The Journal of antibiotics**, [s. l.], v. 28, n. 10, p. 721–6, 1975.

WAICKMAN, A. T.; POWELL, J. D. mTOR, metabolism, and the regulation of T-cell differentiation and function. **Immunological reviews**, [s. l.], v. 249, n. 1, p. 43–58, 2012.

WORLD HEALTHY ORGANIZATION. **Atlas multiple sclerosis resources in the world 2008**, 2008. Disponível em:

<http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241563758_eng.pdf>

XIE, L.; SUN, F.; WANG, J.; MAO, X.; XIE, L.; YANG, S.-H.; SU, D.-M.; SIMPKINS, J. W.; GREENBERG, D. A.; JIN, K. mTOR signaling inhibition modulates macrophage/microglia-mediated neuroinflammation and secondary injury via regulatory T cells after focal ischemia. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, [s. l.], v. 192, n. 12, p. 6009–19, 2014.

XU, H.; WANG, Z.; LI, J.; WU, H.; PENG, Y.; FAN, L.; CHEN, J.; GU, C.; YAN, F.; WANG, L.; CHEN, G. The Polarization States of Microglia in TBI: A New Paradigm for Pharmacological Intervention. **Neural plasticity**, [s. l.], v. 2017, p. 5405104, 2017.

YE, J.; JIANG, Z.; CHEN, X.; LIU, M.; LI, J.; LIU, N. The role of autophagy in pro-inflammatory responses of microglia activation via mitochondrial reactive oxygen species in vitro. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], v. 142, n. 2, p. 215–230, 2017.

YIN, H.; LI, X.; ZHANG, B.; LIU, T.; YUAN, B.; NI, Q.; HU, S.; GU, H. Sirolimus ameliorates inflammatory responses by switching the regulatory T/T helper type 17 profile in murine colitis. **Immunology**, [s. l.], v. 139, n. 4, p. 494–502, 2013.

YIP, C. K.; MURATA, K.; WALZ, T.; SABATINI, D. M.; KANG, S. A. Structure of the human mTOR complex I and its implications for rapamycin inhibition. **Molecular cell**, [s. l.], v. 38, n. 5, p. 768–74, 2010.

ZHENG, H.; CHENG, B.; LI, Y.; LI, X.; CHEN, X.; ZHANG, Y.-W. TREM2 in Alzheimer's Disease: Microglial Survival and Energy Metabolism. **Frontiers in aging neuroscience**, [s. l.], v. 10, p. 395, 2018.

ZHENG, N.; DING, X.; JAHAN, R. Low Concentration of Rapamycin Inhibits Hemangioma Endothelial Cell Proliferation, Migration, and Vascular Tumor Formation in Mice. **Current Therapeutic Research**, [s. l.], v. 76, n. 92, p. 99–103, 2014. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.curtheres.2014.09.004>>

ZHONG, L.; ZONG, Y.; SUN, L.; GUO, J.; ZHANG, W.; HE, Y.; SONG, R. Resveratrol Inhibits Inflammatory Responses via the Mammalian Target of Rapamycin Signaling Pathway in Cultured LPS-Stimulated Microglial Cells. [s. l.], v. 7, n. 2, 2012.



Anexo



Anexo I - Certificado CEUA Nº 1118



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



Certificado

Certificamos que o projeto intitulado "Efeito da Rapamicina em células de animais com encefalomielite autoimune experimental", Protocolo nº 1118-CEUA, sob a responsabilidade de **Alexandrina Sartor e Patricia Aparecida Borim**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 9 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS** (CEUA), nesta data.

Finalidade:	() Ensino	(x) Pesquisa Científica
Vigência do Projeto:	Início: 25/9/2018	Término: 25/02/2019
Espécie/linhagem:	Camundongo C57BL/6	
Nº de animais:	24	
Peso:	17-20 gramas	Idade: 6 semanas
Sexo:	fêmeas	
Origem	Biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP- Ribeirão Preto/SP) – CNPJ: 6302530002662	

Botucatu, 21 de setembro de 2018.

Prof. Dr. Bruno Cesar Schimming
Coordenador da CEUA

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA
Instituto de Biociências da Unesp – Câmpus de Botucatu
Rua Prof. Dr. Antonio Celso Wagner Zanin, 250 - Distrito de Rubião Júnior - CEP 18618-689 Botucatu/SP
Tel 14 3880 0851 mail: secda@ibb.unesp.br

