

SANDRA REGINA MIRANDOLA

***EFEITO DA IMUNOTERAPIA COM INTERFERON BETA NA
PRODUÇÃO DE CITOCINAS PELOS LEUCÓCITOS DE
PACIENTES PORTADORES DE ESCLEROSE MÚLTIPLA.***

CAMPINAS

2004

SANDRA REGINA MIRANDOLA

***EFEITO DA IMUNOTERAPIA COM INTERFERON BETA NA
PRODUÇÃO DE CITOCINAS PELOS LEUCÓCITOS DE
PACIENTES PORTADORES DE ESCLEROSE MÚLTIPLA.***

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do Título de Mestre
em Ciências Médicas, área de Ciências Biomédicas.*

ORIENTADORA: LEONILDA MARIA BARBOSA DOS SANTOS

CAMPINAS

2004

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

M672e Mirandola, Sandra Regina
 Efeito da imunoterapia com interferon beta na produção de
citocinas pelos leucócitos de pacientes portadores de esclerose múltipla
/ Sandra Regina Mirandola. Campinas, SP : [s.n.], 2004.

 Orientador : Leonilda Maria Barbosa dos Santos
 Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

 1. *Citocinas. 2. *Auto - imunidade. 3. *Proteínas básicas de
mielina. I. Leonilda Maria Barbosa dos Santos. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientadora: Profa. Dra.

Leonilda Maria Barbosa dos Santos

Membros:

1. Prof. Dr. Paulo Maria Ferreira Araújo (titular)

2. Prof. Dr. Mauro Walter Vaisberg (titular)

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 06/08/2004

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida, meus pais **Antonio Carlos Mirandola e Maria Amélia Piconi Mirandola**.*

Este trabalho é fruto do apoio constante concedido por vocês, do amor, compreensão e incentivo.

Nenhuma palavra seria capaz de descrever todo amor e gratidão...

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **DEUS** por ter-me como sua filha amada e direcionar-me nesta caminhada;

À **Profa. Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos** pelo exemplo profissional, pela dedicação, garra e força de vontade que me incentivaram nos momentos difíceis, e pela compreensão durante alguns momentos difíceis da minha vida;

À minha família: **meus pais, e meu irmão Marco Antonio Mirandola**, que sempre acreditaram em meu trabalho, me incentivaram e apoiaram minhas decisões;

Ao **Ricardo Lima Braga**, por ter estado ao meu lado durante estes últimos anos. Agradeço pela sincera amizade e sentimento de amor que sempre existiram.

À minha **vozinha Elvira Helena Schinor** pela presença constante no decorrer destes anos, e principalmente nesta etapa da minha vida,

As minhas amigas **Lívia Carla de Souza, Renata Sacurai, Adriana Mendes Vinagre, Soraya de Souza Suzuki e Junia Hidalgo Ferreira**, por me oferecerem palavras de incentivo;

Aos casais e amigos: **Fernanda/Evaldo Marinheiro e Isabel/Jorge Horita** pela amizade, apoio e conforto nas horas difíceis;

Aos colegas de faculdade que ainda hoje fazem parte da minha vida, agradeço pela amizade e apoio constante;

À todos os professores do departamento de Microbiologia e Imunologia, mas principalmente ao **prof. Dr. Paulo Maria Ferreira Araújo**, por toda ajuda e incentivo nestes anos em que foi meu professor de graduação e o exemplo que se tornou para minha formação pessoal;

Aos colegas de trabalho do Laboratório de Neuroimunologia, por terem contribuído, cada um a sua forma, com este trabalho;

Aos **funcionários** do Departamento de Microbiologia e Imunologia, pela ajuda e por serem sempre prestativos;

À **Cecília Yukie Hirata Godoy**, secretária do departamento de neurologia, pela atenção e carinho com que sempre me recebeu;

Aos **pacientes portadores de Esclerose Múltipla** do ambulatório de neurologia da FCM, pela confiança e constante ajuda no desenvolvimento deste trabalho, pois sem sua colaboração seria impossível a execução deste;

Ao **co-orientador e prof. Dr. Benito Pereira Damasceno** e aos residentes Clodoaldo Pirani Jr, Glauco Camargo Igliori e Ana Lúcia Andrade Noronha, por facilitarem o acesso aos pacientes no ambulatório de Neurologia do Hospital das Clínicas da UNICAMP a esta pesquisa;

À enfermeira **Leda** e as auxiliares de enfermagem, **Solaine, Édna e Ruth**, do ambulatório de Neurologia do Hospital das Clínicas da UNICAMP, por estarem sempre auxiliando esta pesquisa;

Agradeço à **Banca examinadora** pela prontidão na leitura, análise do trabalho e pelas valiosas sugestões para o aprimoramento do mesmo;

Agradeço especialmente à **CAPES** pelo apoio financeiro e concessão da bolsa de estudos.

“Quanto melhor é adquirir a sabedoria do que o ouro! E quanto mais excelente é escolher o entendimento do que a prata”.

PROVÉRBIOS 16:16

	<i>PÁG.</i>
RESUMO	<i>xii</i>
ABSTRACT	<i>xv</i>
INTRODUÇÃO	18
OBJETIVOS	36
CAPÍTULO 1 (Submetido) “IMMUNOREGULATORY MECHANISMS IN PERIPHERAL BLOOD CELLS OF PATIENTS WITH MULTIPLE SCLEROSIS RECEIVING TREATMENT WITH INTERFERON BETA”	38
DISCUSSÃO	63
CONCLUSÃO	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
ANEXOS	81

LISTA DE ABREVIATURAS

CSF	Líquido Céfalorraqueano
EM	Esclerose Múltipla
EDSS	Escala expandida do Estado de Incapacidade
E-Selectina	Molécula de Adesão ao Endotélio-Leucócito
IL10	Interleucina 10
IL12	Interleucina 12
IFN γ	Interferon Gama
IFN β	Interferon Beta
IgE	Imunoglobulina E
IgM	Imunoglobulina M
ICAM-1	Molécula intracelular de Adesão
MBP	Proteína básica de Mielina
MAG	Glicoproteína Associada à Mielina
MOG	Glicoproteína de Mielina do Oligodendrócito
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MRI	Ressonância Nuclear Magnética
PPMS	Progressiva Primária
PHA	Fitohemaglutinina
PLP	Proteolipoproteína
RRMS	Recorrente-Remitente
SNC	Sistema Nervoso Central
SCP	Sistema Nervoso Periférico

SPMS	Progressiva Secundária
SF	Sistemas Funcionais
TNF α	Fator de Necrose Tumoral
TGF β	Fator Transformador de Proliferação
TCR	Receptor de Célula T
VCAM-1	Molécula de Adesão Vascular

LISTA DE TABELAS

	<i>PÁG.</i>
Pacientes Portadores de Esclerose Múltipla Tratados com IFN β	82
Pacientes Portadores de Esclerose Múltipla Não Tratados com IFN β	84
Indivíduos Normais.....	85

RESUMO

O desenvolvimento da tolerância imunológica a antígenos próprios, é resultado de mecanismos que conduzem à supressão de clones de linfócitos específicos aos componentes da mielina, podendo ser um dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da tolerância aos neuro-antígenos. Entre os mecanismos mais estudados estão: deleção, anergia dos clones auto-reativos e os mecanismos regulatórios exercidos pelas citocinas. Evidências clínicas e experimentais sugerem que, anormalidades dos linfócitos T e das citocinas, produzidas pelas células TH1, estão envolvidos no desenvolvimento de doenças auto-imunes órgão-específicas como a Esclerose Múltipla.

A Esclerose Múltipla (EM) é a mais importante doença desmielinizante que afeta o homem. Patologicamente é caracterizada pela inflamação e desmielinização de múltiplas áreas da substância branca do SNC, com posterior lesão do oligodendrócito, resultando clinicamente em disfunção neurológica. Embora seja uma doença órgão-específica, com resposta imunológica voltada ao SNC, estudos mostram alterações imunológicas nas células do sangue periférico. As células T auto-reativas, dos pacientes com EM, reconhecem componentes da mielina, como a proteína básica de mielina (MBP), contribuindo à patogenicidade da doença.

Uma das abordagens terapêuticas não específica, utilizada no tratamento da Esclerose Múltipla é o Interferon Beta (IFN β). Nestas duas últimas décadas, alguns estudos foram concluídos, mostrando, de uma forma geral, que a administração do IFN β (tanto 1a como 1b) tem efeito benéfico no tratamento da EM na forma surto-remissão e mais recentemente os autores vem utilizando essa abordagem terapêutica também para as formas progressivas da doença (GOODKIN, 2000; NEUHAUS *et al.*, 2003). O efeito terapêutico do interferon tipo I, o IFN beta em particular, mostrou exercer efeito benéfico aos pacientes tratados, diminuindo o número de exacerbações durante o primeiro ano de tratamento (FILLIPPINI *et al.*, 2003), e em alguns casos tais efeitos benéficos duraram acima de 5 anos (MS group, 1995). O efeito terapêutico foi confirmado pela diminuição das lesões verificadas por MRI (PATY *et al.*, 1993).

Como a imunoterapia, com IFN β , tem mostrado efeitos benéficos aos pacientes portadores de Esclerose Múltipla (EM) na forma surto-remissão, resolvemos acompanhar o efeito da terapia com IFN β na produção de citocinas dos pacientes em tratamento ou não, assim como em indivíduos normais.

Os resultados obtidos, mostraram um aumento significativo na produção das citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF α e IFN γ no plasma e cultura de leucócitos dos pacientes com EM não tratados. A administração do IFN β reduz, significativamente, os níveis das citocinas pró-inflamatórias, com simultâneo aumento na produção de IL10 e, mais discretamente, na produção de TGF β .

Sugere-se então, que a polarização da produção das citocinas pró-inflamatórias participa da cascata de eventos, que leva à desmielinização e que, a administração *in vivo* de citocinas, como IFN β , pode mudar o curso da resposta inflamatória.

ABSTRACT

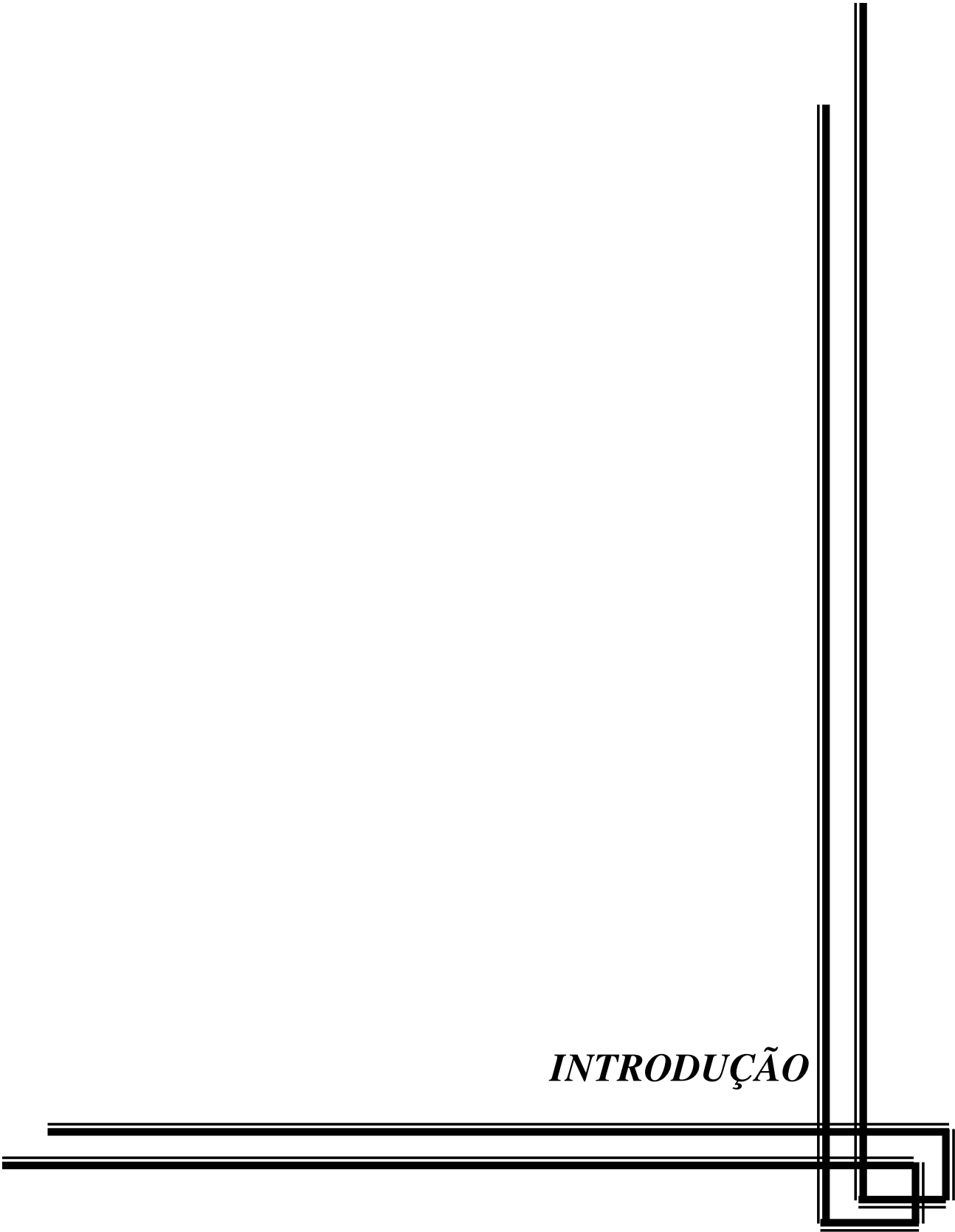
Multiple Sclerosis (MS) is the most important demyelinating disease that affects man. Pathologically, it is characterized by the inflammation and demyelination of various areas of the brain, resulting in a clinically - diagnosed neurological dysfunction. Although it is organ-specific, with an immune response aimed at components of the central nervous system, studies have shown immunological alterations in peripheral blood cells. Autoreactive T cells to recognize myelin components such as myelin basic protein (MBP) and thus contribute to the pathogenesis of the disease.

Immunotherapy with IFN β shows remarkable beneficial effects in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis (MS), although the mechanisms by which it exerts these beneficial effects remain poorly understood. Investigation was made of the effects of IFN β on proinflammatory and anti-inflammatory cytokine production in peripheral blood cells in MS patients, both untreated and those undergoing immunotherapy, as well as healthy controls.

The development of tolerance to the body's own antigens is the result of mechanisms which lead to the suppression of lymphocyte clones specific for myelin components. Among the best known of these mechanisms are the elimination of self-reacting clones. The suppression of the immune response may be one of the mechanisms involved in the development of tolerance to the neuro-antigens. Among the mechanisms which are most commonly studied are the elimination of the self reactive clones, clonal anergy and the immunoregulatory mechanisms exercised by the cytokines. Clinical and experimental evidence suggest that abnormalities of the T lymphocytes and of the cytokines produced by the TH1 cells are involved in the development of organ-specific auto-immune diseases such as Multiple Sclerosis.

Results show a significant increase in the production of proinflammatory cytokine such as TNF α and IFN γ in the plasma and in the supernatant of a leukocyte culture from MS patients with the untreated disease, whereas IFN β administration significantly reduces these levels, this was accompanied by a significant increase in the production of IL10 and a slight increase in that of TGF β .

This reduction in proinflammatory cytokine production in the treated MS patient group accompanied by a simultaneous increase in the production of anti-inflammatory cytokines, suggests that the beneficial effects of IFN β immunotherapy results, at least in part from the modulation of cytokine patterns.



INTRODUÇÃO

A recepção de um estímulo sensitivo ou motor, parte ou chega ao sistema nervoso central (SNC) através de um sistema de condução, mediada pelo neurônio, unidade estrutural e funcional do sistema nervoso. O sistema nervoso periférico (SNP) é o responsável por receber tal informação e o SNC pelos processos de integração, análise e resposta.

Existem células especializadas que recobrem os neurônios. No SNC, essas células são denominadas astrócitos e oligodendrócitos, enquanto, no SNP, são denominadas células capsulares e células de Schwann. Os oligodendrócitos e células de Schwann formam bainhas de mielina em torno dos axônios, os quais aumentam a velocidade de condução do impulso ao longo do axônio. Em algumas doenças, como na Esclerose Múltipla, verifica-se o comprometimento de tais células nervosas.

Charcot, em 1868, estabeleceu a Esclerose múltipla como entidade clínica e patológica, caracterizando-a como uma doença, predominantemente, da substância branca do SNC (KURTZKE, 1983), sendo uma das causas mais frequentes de comprometimento neurológico em adultos jovens (18-45 anos).

O diagnóstico é fundamentado em dados de anamnese e avaliação da evolução das manifestações neurológicas. Aumento da síntese de imunoglobulina intratecal, predominando a IgG no líquido céfalo-raqueano (CSF) e os aspectos de neuroimagem por ressonância nuclear magnética, também auxiliam este diagnóstico.

A incidência da EM é maior em países de clima frio ou temperado, sendo mais rara nas regiões de clima tropical. Não temos suficiente informação sobre a incidência ou o padrão imunogenético dos pacientes no nosso meio.

Sabe-se que é uma doença polimórfica, sendo descritas as formas surto-remissão e progressivas primárias e secundárias (POSER *et al.*, 1983). A forma surto-remissão ou remitente-recorrente da EM (RRMS) evolui em surtos bem individualizados, podendo haver recuperação completa ou quase completa. A severidade e a frequência de surtos varia entre os pacientes; no entanto, a incapacidade aumenta gradualmente com o tempo (EDSS), embora o curso seja imprevisível e as remissões possam durar anos.

Em média, depois de 10-15 anos, 50% de pacientes com RRMS evoluem para a forma progressiva secundária (SPMS). Na forma SPMS a recuperação das exacerbações passa a ser incompleta, causando uma progressiva deterioração da condição física, com aumento da incapacidade física. A forma progressiva primária da doença (PPMS) se caracteriza, desde o início, por doença progressiva e a condição clínica do paciente, deteriora continuamente, sem o aparecimento de surtos (POSER et al., 1983).

Embora a etiologia ainda seja desconhecida, sabe-se que se trata de uma doença, multifatorial, de natureza auto-imune, caracterizada pela inflamação e desmielinização da substância branca do SNC, com posterior lesão do oligodendrócito, destruição axonal e falta de alterações patológicas em outros órgãos (WAKSMAN, 1985; STEINMAN, 1996).

Dentro das possíveis hipóteses da patogênese da Esclerose Múltipla, podem ser considerados: fatores ambientais e/ou infecciosos (WUCHERPFENING e STROMINGER, 1995; WILLER e EBERS, 2000), associados a fatores genéticos (HERRERA e EBERS, 2003). Estudos experimentais de doenças desmielinizantes do SNC, adquiridas após infecção viral (encefalomielite aguda disseminada) ou imunização (encefalomielite experimental auto-imune), permitiram evidenciar que os vírus podem ocasionar, após longos períodos de incubação, destruição da mielina, inclusive com períodos de remissão e exacerbação (KURTZKE, 1983; WUCHERPFENING, 1995). E estes fatores infecciosos representam um gatilho às manifestações das reações auto-ímunes contra a mielina do SNC, em indivíduos geneticamente susceptíveis (NIEPEL e CONSTANTINESCU, 2003).

Muito do conhecimento adquirido sobre a resposta inflamatória na EM, é devido ao estudo desenvolvido no modelo experimental, a Encefalomielite Experimental Auto-imune (EAE).

A EAE começou a ser estudada após a descoberta da vacina contra a raiva, por Pasteur, em 1875. O vírus da raiva era cultivado em células do encéfalo de animais de experimentação (coelhos) e depois uma preparação, não muito purificada, era transferida para os indivíduos contaminados com vírus rábico. No entanto, devido à resposta imune cruzada com estruturas do encéfalo do animal hospedeiro do vírus, alguns indivíduos

apresentavam uma encefalite pós-vacinal, muitas vezes fatal. A EAE passou então, a ser considerada modelo experimental para o estudo dos mecanismos imunopatológicos nas doenças inflamatórias desmielinizantes de natureza auto-imune.

Em laboratório, a EAE pode ser induzida em ratos e camundongos geneticamente susceptíveis, através da imunização com mielina ou seus componentes como a proteína básica de mielina (MBP), a proteolipoproteína (PLP), glicoproteína associada à mielina (MAG), glicoproteína de mielina do oligodendrócito (MOG), imunização com os epítomos encefalitogênicos desses componentes, ou ser transferida para animais normais por clones de linfócitos sensibilizados a estes neuroantígenos (LIDER *et al.*, 1989).

A EAE é mediada por linfócitos T CD4 e manifesta-se clinicamente, por deficiência neurológica, histologicamente, por infiltração perivascular de células mononucleares no encéfalo, e imunologicamente, pela presença de resposta celular e humoral aos componentes da mielina (HALLAL *et al.*, 2003).

O SNC de indivíduos normais é considerado, imunologicamente, privilegiado por não apresentar tecido linfóide organizado e pela existência da barreira hemato-encefálica (BHE), que restringe a entrada de células e moléculas complexas para o tecido cerebral. Após amadurecimento no timo, o linfócito T, não comprometido com o antígeno, se lança na corrente sanguínea e circula por todo o corpo. O processo de entrada e transmigração de linfócitos T é governado por um conjunto de moléculas de adesão, que são expressas tanto nas células endoteliais, como nos leucócitos (HARTUNG *et al.*, 1995). O reconhecimento e a apresentação de antígenos ocorrerá nos tecidos linfóides.

A migração dos leucócitos para o local da inflamação segue três etapas: inicialmente, os leucócitos fazem o movimento (rolling) e se ligam fracamente ao endotélio, pelas interações de baixa afinidade entre as selectinas e seus ligantes nas células recíprocas, resultando no rolamento dos leucócitos ao longo da superfície endotelial e permitindo que tais células possam aderir e migrar para o tecido inflamado.

Na medida em que os leucócitos vão rolando sobre a superfície endotelial, vão sendo ativados pelas citocinas que estão expostas nas células endoteliais e ficam fortemente ligados ao endotélio. E, finalmente, a interação com as integrinas, como as moléculas de

adesão intracelular (ICAM-1) e a molécula de adesão vascular (VCAM-1), com seus respectivos ligantes promovem uma forte ligação, antes da migração transendotelial acontecer (WASHINGTON *et al.*, 1994; DORE-DUFFY *et al.*, 1995; TSUKADA *et al.*, 1993). A expressão dessas moléculas aumenta sob a ação de citocinas geradas durante o curso da resposta inflamatória (SPRINGER, 1994; BEVILAQUA, 1993), podendo ser medida nos fluidos corpóreos (GEARING e NEWMAN, 1993; BRUSTEIN *et al.*, 1992).

O aumento dos níveis das moléculas de adesão no soro e no líquido céfaloorraqueano, dos pacientes com EM, está correlacionado ao dano da barreira hematoencefálica e lesões desmielinizantes (SHARIEF *et al.*, 1993; HARTUNG *et al.*, 1995), evidenciando o processo inflamatório e os mecanismos de desmielinização auto-imune.

A ativação das células T ocorre através da apresentação do neuroantígeno, complexado à molécula do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II, pelas APCs presentes na superfície de macrófagos, astrócitos, células da micróglia e endoteliais no SNC (STEINMAN, 1996).

Há dois subgrupos de linfócitos T, divididos de acordo com o co-receptor expresso em sua superfície. Os linfócitos T CD4, ou *helper*, reconhecem o complexo peptídeo e moléculas do complexo principal de histocompatibilidade MHC de classe II e os linfócitos T CD8 ou citotóxicos, reconhecem o antígeno peptídico juntamente com a proteína MHC de classe I. A diferenciação das células T CD4 em subtipos de células efectoras é determinada pelo tipo de citocinas produzidas durante o reconhecimento do antígeno. As APCs capturam o antígeno e o apresentam às células T helper, estas são ativadas por citocinas liberadas pelas próprias APCs, como é o caso da IL-1, que induz a expressão de receptores para a IL-2. A IL-2 induz o crescimento de outras células T helper, assim como o de células T citotóxicas, fagócitos, células NK e células B.

Em geral, nos processos inflamatórios, os macrófagos estão envolvidos na síntese e liberação de várias citocinas, produzindo IL12, que estimulam as células NK e as células T a sintetizarem IFN γ , que ativam e atraem outros macrófagos ao sítio da inflamação, além de estimular a proliferação e diferenciação de outros linfócitos T, amplificando a resposta imune mediada por células. Assim na inflamação aguda, os

macrófagos recrutam mais células, aumentando o dano tecidual na placa de desmielinização. A destruição da mielina ocorre também pela ação dos anticorpos, que podem ativar o sistema complemento, colaborando com o ataque à bainha de mielina (ANDERSSON e GOODKIN, 1998).

Embora a EM seja uma doença órgão-específica, com resposta imune voltada aos componentes do SNC, alguns estudos mostram alterações imunológicas também no sangue periférico, como: ativação de linfócitos T, que reconhecem componentes da mielina, alteração no padrão de síntese de citocinas e de seus receptores (HAFLER e WEINER, 1989; OTA *et al.*, 1990; COSTA *et al.*, 2000; HALLAL-LONGO *et al.*, 2004).

Essas agressões, aos componentes próprios do organismo, são verificadas, em geral, em condições patológicas, pela perda dos mecanismos de tolerância imunológica.

O fenômeno da tolerância imunológica pode ser entendido como a não resposta imune específica, contra um determinado tipo de antígeno. A tolerância aos auto-antígenos é ativamente conseguida e os linfócitos, tanto B como T, potencialmente auto-reativos, são, de certa forma, inativados. Este processo de inativação das células potencialmente auto-reativas, ocorre durante a maturação celular nos órgãos linfóides primários e os antígenos encontrados nesses órgãos são normalmente antígenos próprios.

Dessa forma, nessa etapa de maturação, os linfócitos encontrarão apenas os antígenos próprios associados às moléculas de MHC, tornando-se tolerantes, num processo conhecido como tolerância central. A tolerância central, no entanto, não garante que as células que deixam os órgãos linfóides primários e vão popular os órgãos linfóides secundários, não atuem como células auto-reativas. Assim, a autoimunidade, pode ser entendida como um processo fisiológico normal, onde o organismo convive com as células e os anticorpos potencialmente auto-reativos, sem, necessariamente, desenvolver doenças auto-imunes. Alguns autores, inclusive, acreditam que a presença de auto-anticorpos e células que reconhecem o próprio, sejam indispensáveis para a homeostase do organismo (SCHWARTZ e COHEN, 2000).

Portanto, as doenças auto-imunes surgem, quando há disfunção nos mecanismos responsáveis pela manutenção da tolerância. E dentre os fatores que contribuem para a não ativação dos linfócitos T aos antígenos próprios, estão: a deleção dos clones auto-reativos, a indução de anergia e o desvio da resposta imune, causado pela polarização da produção de determinadas citocinas.

A deleção clonal de células efectoras é o mecanismo pelo qual clones de linfócitos, são eliminados por morte celular, normalmente por apoptose, ao entrarem em contato com o excesso de antígeno ou de citocinas (LENARDO *et al.*, 1999).

A anergia é o processo em que clones, antígeno-específicos, são funcionalmente inativados, mas não destruídos. Basicamente, os linfócitos T necessitam de dois sinais para que ocorra a expansão clonal. O primeiro é dado pela interação entre o peptídeo antigênico com as moléculas de MHC das células apresentadoras do antígeno e o receptor para o antígeno presente nos linfócitos T (TCR). O segundo sinal é dado pela ligação de moléculas co-estimulatórias presentes tanto nos linfócitos, como nas células apresentadoras do antígeno (MUELLER *et al.*, 1989).

Algumas famílias de moléculas co-estimulatórias (como a CD40 expressas na superfície de linfócitos B) estão sendo descritas; no entanto, as moléculas mais estudadas são CD28 e CTLA4 (CD152), expressas nos linfócitos, que se ligam às moléculas CD80 e CD86, presentes nas células apresentadoras do antígeno (LENSCHOW *et al.*, 1996).

A ligação de moléculas CD80 e CD86 das APCs à CD28, libera sinais para as células T, que induzem expressão de proteínas anti-apoptóticas, estimulam a ativação de fatores de crescimento e de outras citocinas, promovem a proliferação e diferenciação de células T e aumentam a expressão dos receptores de IL2 nas células T, previamente ativadas. A molécula CTLA4 é homóloga à CD28 e transmite sinais que inibem a ativação das células T (CHITNIS e KHOURY, 2003). Estudos utilizando anticorpos monoclonais anti-CTLA4 forneceram as primeiras evidências sobre a função da molécula CTLA4. Verificou-se que os anticorpos anti-CTLA4 bloqueavam sinais inibitórios para a ativação das células T, através da transdução feita pelo complexo B7/CTLA4 (KRUMMEL e ALLISON, 1995). Sendo assim, a manipulação dos sinais co-estimulatórios representam

um mecanismo importante para inibição da ativação imunológica, podendo induzir e manter a tolerância das células T aos antígenos próprios (SHARIEF *et al.*, 1993, HARTUNG *et al.*, 1995).

Constatou-se um aumento na expressão *in vitro* das moléculas CD80 e CD86 nas micróglia e nos astrócitos durante a fase aguda da resposta inflamatória, sugerindo seu importante papel na apresentação do antígeno no SNC (NIKCEVICH *et al.*, 1997). Estudos recentes demonstraram que a molécula CD28 é expressa nas células T, do SNC, na exacerbação da EAE; enquanto CTLA4, é expressa na fase efetora da doença, tendo um pico durante as remissões (CHITNIS e KHOURY, 2003). Em estudos imunohistoquímicos do tecido do SNC, foi demonstrado que animais tratados com CTLA4, apresentaram inibição na produção de citocinas pró-inflamatórias, com aumento de citocinas anti-inflamatórias como a IL10 e TGF β (KHOURY *et al.*, 1995).

Finalmente, a supressão ativa ou desvio da resposta imune, pela polarização da produção de determinadas citocinas, representa a circunstância pela qual os clones de linfócitos auto-reativos passam a não mais responder frente a um estímulo antigênico, devido à secreção *in situ* de citocinas imunorreguladoras (DRUET *et al.*, 1996).

As citocinas constituem um grupo de moléculas solúveis no plasma e não possuem especificidade para o antígeno, como as imunoglobulinas. Estão envolvidas na emissão de sinais de comunicação durante o desencadeamento das respostas imunes, podendo modular a ação de outras células (BORISH e STEINKE, 2003). Após a transcrição gênica, o RNAm é normalmente instável e a citocina é rapidamente liberada. Geralmente, iniciam sua ação pela ligação a receptores específicos na superfície celular e esta ligação, ativa sistemas de segundos mensageiros intracelulares que, posteriormente, desencadeiam respostas na célula-alvo. Desta forma, as citocinas não funcionam somente como proteínas imunorregulatórias, mas também como fatores de crescimento, diferenciação e morte celular.

A maior parte das citocinas são moléculas constituídas por pequenas ou médias proteínas (~25 kDa) ou glicoproteínas, secretadas por uma variedade de células. Têm papel importante na sinalização dos fenômenos de regulação da homeostase do organismo. A

maioria tem ações autócrina, atuando sobre os receptores das próprias células que as produzem, ou parácrina, atuando em células-alvo vizinhas ou distantes. Em geral, as citocinas são pleiotrópicas, isto é, têm múltiplos efeitos: uma única citocina pode interagir com mais de um tipo de célula, ter múltiplas atividades biológicas, interagir com outras citocinas, com as quais pode ter sobreposição de atividades (MOSMANN e COFFMAN, 1989).

Nos últimos anos, as citocinas foram exaustivamente estudadas no sentido de se entender melhor a regulação da resposta imune. MOSMANN e colaboradores (1986) mostraram que a estimulação antigênica, de linfócitos CD4 “in vitro”, resultava na produção de determinados padrões de linfocinas, que podiam dividir estas células em duas populações funcionalmente distintas. As células TH1, produzem $\text{IFN}\gamma$, IL2 e $\text{TNF}\alpha$ e são responsáveis pela produção de anticorpos IgG2a em murinos, ativação de macrófagos, citotoxicidade e hipersensibilidade tardia (DTH). As células TH2, produzem IL4, IL5, IL6, IL9, IL10 e IL13 e são responsáveis pela função *helper* na resposta imune humoral (LIBLAU *et al.*, 1995). Um terceiro subtipo (TH3), identificado na mucosa intestinal, durante o processo de indução de tolerância oral, produz quantidades consideráveis de fator transformador de proliferação ($\text{TGF}\beta$) (CHEN *et al.*, 1994).

Na EM, verifica-se que, embora a doença seja causada por linfócitos T CD4 ativados pelo neuroantígeno, a participação das células apresentadoras de antígenos é fundamental para a perpetuação da resposta inflamatória no SNC. Células do sistema fagocítico-monocitário, assim como as glias, produzem citocinas como IL1, IL6, $\text{TNF}\alpha$ e $\text{TGF}\beta$, que participam tanto na gênese, como na regulação da resposta inflamatória.

Utilizando culturas organotípicas, pôde-se demonstrar tanto a produção local de citocinas, como a indução da atividade mielinotóxica por IL1, $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IFN}\gamma$. Portanto, as interações entre as células residentes no SNC e citocinas pró-inflamatórias, produzidas por elas, desempenham um papel crucial na fisiopatologia da EM e seu modelo experimental, modulando o processo de inflamação (BROSNAN *et al.*, 1995).

Paralelamente à liberação de citocinas, com efeito pró-inflamatório, através das células fagocitárias, durante o processo de apresentação do antígeno, as APCs ainda produzem citocina, como a IL12, que irá contribuir no desenvolvimento do padrão linfocitário TH1. A IL12 foi, originalmente, identificada como um ativador da função citotóxica da célula NK e, apesar de ser produzida pelas APCs, é essencial tanto na resposta inata como na adquirida.

Em muitos sistemas experimentais, a IL12 mostrou-se necessária para o desenvolvimento das células TH1, promovendo, secundariamente, aumento da produção de IFN γ , ativação de macrófagos e do sistema complemento; sendo que, tal produção, é suprimida pela IL4 e IL10 (OZMEN *et al.*, 1995).

Na EAE, verificou-se que o tratamento com IL12 aumenta a severidade e a duração da doença, mas que, anticorpos anti-IL12 previne os surtos. E ainda, que animais geneticamente deficientes para IL12, apresentam resistência à doença (KARP *et al.*, 2000).

Em pacientes portadores de EM foi observado aumento significativo desta citocina (LOS Y *et al.*, 2002) e isso está relacionado com o aumento das lesões da substância branca do SNC, detectado por MRI (MAKHLOUFK *et al.*, 2001).

Quanto à produção do TNF α , essa citocina foi descrita pela primeira vez devido à propriedade de induzir necrose hemorrágica em certos tumores, em animais tratados com lipopolissacarídeo. O TNF α é produzido, predominantemente, por macrófagos ativados, mas também podem ser secretado por células T estimuladas pelo antígeno, células NK e mastócitos (SEDGWICH *et al.*, 2000). O TNF α e a IL1 estão entre os mais importantes indutores da resposta inflamatória aguda, em que os hepatócitos produzem quantidades aumentadas de certas proteínas plasmáticas, como fator C3 do complemento, proteína C reativa, IL6 e proteína de ligação da manose. É o TNF α que faz com que as células endoteliais expressem receptores de superfície, tornando a superfície endotelial adesiva, inicialmente, para os neutrófilos e subsequente, para os monócitos e linfócitos que induzem o recrutamento dos leucócitos para a área inflamada.

Em alguns estudos imunohistoquímicos, foi demonstrada a presença de $\text{TNF}\alpha$ nas lesões de desmielinização da EM aguda e crônica, assim como na EAE (NAVIKAS e LINK, 1996, FARIAS *et al.*, 2004), estando diminuída na fase de recuperação da doença. Alguns autores, mostraram que a determinação dos níveis de $\text{TNF}\alpha$ tanto do sangue periférico, como no líquido céfalorraqueano, pode ser utilizada para prever o aparecimento dos surtos em pacientes com EM (BONGIOANNI *et al.*, 1999).

Esta citocina atua de forma essencial na cascata de eventos que resultam na desmielinização e na lesão axonal, devido ao seu comprovado efeito mielinotóxico (SELMAJ *et al.*, 1991). Por outro lado, estudos realizados em animais com deleção do gene para o $\text{TNF}\alpha$, desenvolvem a EAE normalmente, indicando a redundância funcional das citocinas pró-inflamatórias. Talvez, na falta de $\text{TNF}\alpha$, é provável que haja a compensação pelo $\text{IFN}\gamma$ na gênese da doença (SELMAJ *et al.*, 1998).

Em 1957, foi descoberto que células expostas a vírus inativados produziam um fator solúvel, capaz de “interferir” na replicação viral, quando aplicado a células recém-infectadas. O fator foi denominado interferon (IFN), e constatou-se que os interferons são uma família de proteínas, que não apenas compartilham atividade antiviral, mas também têm a capacidade de inibir a proliferação de células dos vertebrados e modular respostas imunológicas. ISAAC e LINDENMANN reconheceram dois principais tipos de interferons: Interferon tipo I: α e β , são produzidos por todas as células de mamíferos e estão envolvidos na inibição da replicação viral. Interferon tipo II: o Interferon γ , produzido por linfócitos TH1 CD4+ e por células NK, também induzem a inibição da replicação viral e são potentes estimuladores de macrófagos e da apresentação de antígenos.

A maioria dos tipos celulares tem a capacidade de sintetizar IFN do tipo I e, com efeito, estas células o fazem em resposta a infecções por vírus, bactérias ou protozoários ou quando expostas a certas citocinas (KOMATSU, 2002). O IFN do tipo II é uma citocina secretada por quase todas as células TH1 ativadas. Uma vez secretada, essa citocina aumenta a expressão das proteínas do MHC tipo II e promove a apresentação de antígenos aos linfócitos T CD4. O $\text{IFN}\gamma$ é um potente ativador de macrófagos, aumentando a atividade microbicida e induzindo-os a secretarem IL1, IL6, IL8 e $\text{TNF}\alpha$. Sua produção

pode inibir a síntese de citocinas pelos linfócitos TH2. No entanto, o IFN γ não apenas diminui a produção de IL4, pelas células TH2, inibe ainda, os efeitos da IL4 sobre as células B, promovendo a produção de IgG1 e impedindo a troca de classe de imunoglobulinas para IgE (NEUHAUS *et al.*, 2003). Mas, por outro lado, a produção de IFN γ pode ser inibida pela ação de citocinas imunorreguladoras como o IL4, IL10 e TGF β .

A IL10, foi originalmente, denominada “fator inibidor da síntese de citocinas”, por apresentar capacidade de inibir a produção de citocinas por linfócitos T ativados. É uma proteína secretada, tardiamente, no processo de ativação por células TH2, células T CD8, monócitos e células B ativadas. Inibe a produção de IL2, IFN γ por células TH1 e conseqüentemente, inclina a resposta imunológica a favor das respostas TH2.

Acredita-se que a imunorregulação, na EAE, depende mais da produção de IL10 do que IL4. Foi verificado que camundongos transgênicos para IL4 desenvolvem a doença e camundongos transgênicos para IL10, são completamente protegidos contra a EAE (MARTINO *et al.*, 2002). Em pacientes com EM, foi observada a inibição da produção de IL10, por células TH1, células NK e macrófago-monócito (LIU *et al.*, 2001), com conseqüente aumento de citocinas anti-inflamatórias pelos clones de células T sensibilizados a PLP (MILLER *et al.*, 1993). Esta citocina diminui a capacidade de apresentação do antígeno e inibe a diferenciação de células TH1 (HUANG *et al.*, 2001).

Com relação ao fator de transformação de crescimento (TGF β), sabe-se que constitui uma família de peptídeos codificados por diferentes genes, que regulam o crescimento celular e apresentam efeitos estimulatórios e inibitórios nos diferentes tipos celulares. São produzidos, primariamente, por condrócitos, osteócitos, fibroblastos, plaquetas, monócitos e algumas células T. As células T, que produzem TGF β , produzem algumas vezes, IL10 e/ou IL4. Baseado na produção de TGF β , pelos linfócitos T helper, foi proposto um fenótipo distinto, chamado linfócito repressor ou TH3 (CHEN *et al.*, 1994).

O efeito anti-inflamatório do TGF β , foi confirmado em camundongos nos quais o gene TGF β foi silenciado, esses animais desenvolveram lesões inflamatórias descontroladas, sugerindo a importância desta citocina na manutenção da homeostase. Em

1989, verificou-se a ação do TGF β na inibição da ativação de linfócitos T MBP-específicos, interferindo na indução da EAE por transferência adotiva. Posteriormente, tem sido confirmado que o TGF β é efetivo tanto na prevenção como na reversão dos sinais clínicos, indicando que esta citocina, pela ação anti-inflamatória que exerce, é extremamente importante na regulação da EAE (SPORN e ROBERTS, 1992; CHEN *et al.*, 1996; MILLER *et al.*, 1993). Há evidências de que o TGF β inibe a apresentação dos auto-antígenos por astrócitos e antagoniza a expressão do MHC II, induzido pelo IFN γ e TNF α , além de reduzir a ligação de linfócitos ativados ao endotélio cerebral, tal efeito evita a migração destas células para o sítio da lesão. KHOURY *et al.* (1992) demonstraram a presença de TGF β no cérebro de ratos Lewis que haviam sido tolerizados oralmente com MBP, reforçando a idéia de que células supressoras, geradas pela administração oral do neuro-antígeno, quando em contato com o tolerógeno pela segunda vez, liberam citocinas com ação supressora como TGF β .

Níveis reduzidos de TGF β foram detectados no sangue periférico de pacientes com EM ativa, quando comparado ao grupo controle normal (MOKHATARIAN *et al.*, 1994). Essas observações sugerem que, os antagonistas das citocinas pró-inflamatórias, são de considerável interesse terapêutico nas doenças inflamatórias crônicas.

Atualmente a terapia nas doenças auto-imunes em geral e na EM, em particular, consiste na administração de drogas que levam a imunossupressão global, durante os períodos de exacerbação da doença. No entanto, essas medidas, causam sérios efeitos adversos ao organismo, sem alterar de forma efetiva o curso da doença. Com isso, a procura, de medidas específicas, que tenham ação apenas sobre os clones auto-reativos, tem motivado diferentes grupos de pesquisa.

Várias abordagens terapêuticas têm sido propostas no tratamento da EM, visando minimizar os surtos, prevenir futuras exacerbações e a conseqüente progressão da doença. Com relação as imunoterapias específicas, alguns grupos obtiveram sucesso com abordagens como a vacinação com células T específicas para o neuroantígeno, administração de peptídeos e indução de tolerância com a administração de mielina.

A vacinação com células T (TCV), consiste no isolamento das células T reativas à mielina do sangue periférico dos pacientes com EM, inativação por irradiação destas células e seu retorno ao indivíduo. A TCV difere do modelo de vacinação clássica, pois, os agentes a serem combatidos, são populações de células T auto-reativas. Esta abordagem visa inativar, especificamente, os linfócitos T reativos a mielina. Os resultados promissores, nos modelos experimentais, levaram a ensaios clínicos conduzidos para avaliar o efeito terapêutico em pacientes com EM, existindo evidências de redução no número de surtos nos indivíduos tratados (CORREALE *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2002).

Outro tipo de vacinação utilizada para o tratamento de doenças auto-imunes, é a imunização de peptídeos de TCR (VANDENBARK *et al.*, 1992). A manipulação da interação do TCR com os peptídeos derivados dos neuroantígenos e as moléculas do MHC, tem sido feita com o objetivo de inibir a apresentação de antígeno e, conseqüentemente, alterar a manifestação da doença (VANDENBARK *et al.*, 1992). O mecanismo pelo qual a vacinação por peptídeo de TCR ocorre, é baseado em uma população de células T regulatórias reativas ao peptídeo sintético injetado e, conseqüentemente, aos peptídeos de TCR dos clones auto-reativos (MORGAN *et al.*, 2001).

Células com atividade imunossupressora como a população CD4+CD25+ (Treg) expressam a molécula CTLA4 (READ, MALMSTROM e POWRIE, 2000; TAKAHASHI *et al.*, 2000). A população de células reguladoras CD4+CD25+ são células T que expressam CD25 e possuem uma potente função reguladora produzindo citocinas anti-inflamatórias como a IL10 e TGF β (WEINER & SELKOE, 2002). Takahashi e colaboradores (2000) demonstraram que a CTLA-4 é na verdade uma molécula coestimulatória chave para a ativação das células T reguladoras CD4+CD25+, para que dessa forma, essa população possa suprimir e controlar as células T auto-reativas. O bloqueio do CTLA-4 nestas células Treg, leva a perda da autotolerância natural e o aparecimento de doenças auto-imunes.

Está claro que as células Treg existem como parte do repertório imune normal, prevenindo o desenvolvimento de respostas patogênicas para os antígenos intestinais e próprios. READ, MALMSTROM E POWRIE (2000) reportaram que as células Treg que

controlam a inflamação intestinal expressam o mesmo fenótipo que aquelas que controlam a auto-imunidade. Eles revelaram que a função imunossupressora das células Treg *in vivo* é dependente da molécula CTLA4 e de citocinas como TGF β .

Além disso, embora haja controvérsias, acredita-se que um dos mecanismos pelos quais esta molécula regule negativamente a ativação linfocitária seja através da indução de apoptose (SCHEIPERS & REISER, 1998).

A administração do Acetato de Glatirâmer, surgiu como uma possível abordagem terapêutica. Este imunomodulador é um polímero de quatro aminoácidos, que foi originalmente sintetizado como cópia da MBP (JOHNSON *et al.* 1995). Esse composto foi sintetizado com o nome de copolímero 1 e inicialmente, usado para induzir EAE, mas, o copolímero 1 causou efeito oposto, inibindo o desenvolvimento da doença em cobaias (JOHNSON *et al.*, 1995) e desta forma, foi proposta sua aplicação para o tratamento da EM. A administração do Acetato de Glatirâmer mostrou eficácia similar ao Interferon beta, reduzindo os períodos de exacerbação da EM (GE *et al.*, 2000). A ação benéfica do tratamento foi confirmada pela redução do número e volume das lesões ativas, identificadas nas MRI (GE *et al.*, 2000). Embora os mecanismos de ação do acetato de glatirâmer não estejam totalmente esclarecidos, foi observada modificação da resposta imune, como a indução de células T supressoras antígeno-específica, inibição da apresentação de antígeno, polarização da produção de citocinas das células T CD4 TH1 para TH2 (GOODKIN *et al.*, 2001; HUSSIEN *et al.*, 2001) e indução de tolerância (SCHMIED *et al.*, 2003). Por ter alguns aminoácidos em comum com a MBP, a administração oral do acetato de glatirâmer, teve efeito inibidor na EAE e essa via de administração também está sendo testada em pacientes (WEINER e SELKOE, 2002).

A tolerância obtida pela administração oral de mielina e seus componentes como a MBP e PLP, em modelos experimentais, tem se mostrado um meio efetivo de suprimir a EAE. Foi demonstrado que, a administração oral de MBP, reduz a gravidade da EAE (LIDER *et al.*, 1989; WEINER *et al.*, 1994) e que o efeito benéfico, se deve à maior produção de citocinas com ação anti-inflamatórias como a IL4, IL10 e TGF β , tanto no SNC (KHOURY *et al.*, 1992) quanto na periferia (MILLER *et al.*, 1993), ou ainda na mucosa

intestinal (SANTOS *et al.*, 1994; CHEN *et al.*, 1996). Na EM, a administração oral da mielina, parece não bloquear a progressão da doença, mas há evidências do efeito imunorregulador desse procedimento, uma vez que foi observado aumento da produção de TGF β , pelas células dos pacientes tratados (WEINER *et al.*, 1993).

Paralelamente à manipulação das células que exercem atividade supressora na resposta imune, a possível administração *in vivo* de citocinas que levem à polarização da produção de mediadores com o efeito anti-inflamatório, dessa forma, reduzindo os danos causados pelas reações auto-imunes, tem sido buscado por vários grupos de pesquisadores.

No campo da imunoterapia inespecífica, a utilização do Interferon β tem se mostrado a droga mais promissora para o tratamento da EM, desde a aprovação dos corticosteróides, acontecida no início da década de 70 (JACOBS *et al.*, 1996). Os IFNs foram incluídos no tratamento da EM por JACOBS e colaboradores em 1981 e sua utilização para o tratamento da EM, se baseou no caráter recorrente ou continuado da doença, que sugeria infecção viral no SNC (BOOSS *et al.*, 1990) e por atribuir significância patogênica aos achados que mostraram a deficiente produção de IFN γ , pelas células NK, dos pacientes com EM (MERRILL *et al.*, 1982; NEIGHBOUR *et al.*, 1982). Coube a PANITCH e colaboradores (1987), confirmar a ação pró-inflamatória do IFN γ , precipitando o aparecimento de sinais clínicos em portadores da EM. Em contraste, estudos feitos com o IFN β , mostraram a tendência dessa citocina inibir a atividade do IFN γ e reduzir a atividade da EM.

Devido à biotecnologia e o desenvolvimento das técnicas de DNA, a obtenção de interferons, recombinantes ou purificados a partir de células de mamíferos, permitiu o desenvolvimento da produção em larga escala dessa citocina, sendo que os subtipos de IFN β 1a e 1b estão sendo utilizados normalmente na prática médica. Ambos são moléculas com 166 aminoácidos, sendo que o IFN β 1b tem uma serina substituída na posição 17 e o IFN β 1a, é glicosilado no resíduo de arginina na posição 80. As outras estruturas são praticamente idênticas, principalmente o epítipo que se liga aos receptores das células, o resíduo de 32-56 (REDELICH *et al.*, 1991).

Nestas duas últimas décadas, alguns estudos foram concluídos, mostrando, de uma forma geral, que a administração do IFN β (tanto 1a como 1b) tem efeito benéfico no tratamento da EM na forma surto-remissão e mais recentemente os autores vem utilizando essa abordagem terapêutica também para as formas progressivas da doença (GOODKIN, 2000; NEUHAUS *et al.*, 2003). O efeito terapêutico do interferon tipo I, o IFN beta em particular, mostrou exercer efeito benéfico aos pacientes tratados, diminuindo o número de exacerbações durante o primeiro ano de tratamento (FILLIPPINI *et al.*, 2003), e em alguns casos tais efeitos benéficos duraram acima de 5 anos (MS group, 1995). O efeito terapêutico foi confirmado pela diminuição das lesões verificadas por MRI (PATY *et al.*, 1993).

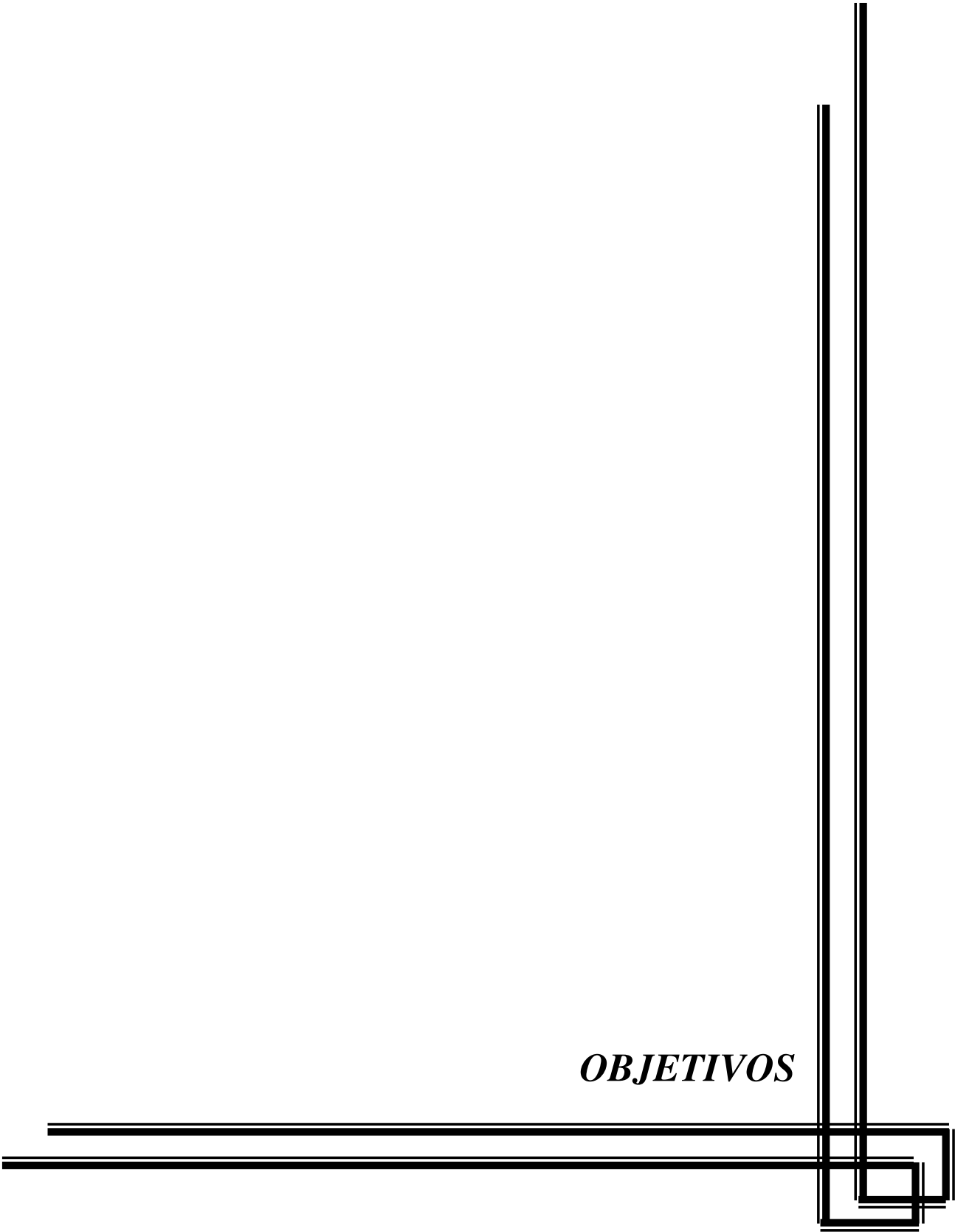
Quanto aos mecanismos responsáveis pelo efeito benéfico desse tratamento em ratos, estudos mostraram que a severidade da EAE, pode ser reduzida pela administração sistêmica de IFN β . A redução da gravidade da doença, obtida pela transferência adotiva de linfócitos encefalitogênicos, também foi observada quando essas células foram previamente incubadas na presença do IFN β (RUULS e SEDGWICK, 1998). Na EAE, houve melhora da doença associada à ausência de infiltrado de leucócitos no SNC, reduzindo, de forma significativa, a expressão das moléculas de adesão nas células endoteliais, indicando que o tratamento é direta ou indiretamente responsável pela inibição da migração das células ao SNC (NEUHAUS *et al.*, 2003). O efeito do tratamento, sobre a produção de citocinas, também mostrou significativa diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF α (CHABOT *et al.*, 2000), em contraste com o aumento nos níveis de IL10 e TGF β , associado com a redução da gravidade da doença (RUULS e SEDGWICK, 1998; YASUDA *et al.*, 1999; CHABOT *et al.*, 2000). A redução da expressão de CD80, também foi, recentemente, descrita em nosso laboratório (HALLAL *et al.*, 2003).

Em paciente com EM, verificou-se que o IFN β reduz a resposta proliferativa de linfócitos, através da inibição dos receptores de IL2 e diminuição da expressão das moléculas de MHC de classe II, tanto nas células da glia quanto endoteliais. O tratamento diminui a produção de IL12 e IFN γ e aumenta os níveis de IL10 (RUULS e SEDGWICK, 1998; KARP *et al.*, 2000; HUSSIEN *et al.*, 2001; BYRNER *et al.*, 2002). Na terapia com IFN β foram observados, ainda, uma redução do número de células B CD80+ circulantes

(GENÇ *et al.*, 1997) e aumento da expressão da molécula CD80, em monócitos e em células dendríticas do sangue periférico de pacientes portadores de EM (GENÇ *et al.*, 1997; HUSSEN *et al.*, 2001), associado ao aumento da expressão da molécula CTLA4, induzindo uma sinalização negativa (HALLAL-LONGO *et al.*, 2004).

Certamente, ainda se faz necessário o investimento em pesquisa experimental e clínica, para o melhor entendimento da fisiopatologia dos processos auto-imunes inflamatórios do SNC. A busca de estratégias terapêuticas com baixa toxicidade, que possa ser administrada desde o início da doença, de forma continuada e que seja capaz de bloquear a progressão da doença deve continuar a ser o objetivo de vários estudos multicêntricos.

O entendimento dos fatores que levam à polarização e diferenciação dos grupos celulares é muito importante, uma vez que serve como base para toda manipulação profilática e/ou terapêutica de patologias relacionadas às funções de células TH1 ou TH2/TH3. Por este motivo, nosso objetivo foi estudar o padrão de citocinas produzidas em indivíduos normais, pacientes tratados ou não com IFN β .



OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi:

Quantificar o padrão de citocinas com ação inflamatória (TH1): $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$ e IL12 , assim como, citocinas com padrão anti-inflamatório (TH2): IL10 e (TH3): $\text{TGF}\beta$, produzidas pelos leucócitos do sangue periférico, de pacientes portadores de Esclerose Múltipla tratados e não tratados com $\text{IFN}\beta$, assim como em indivíduos normais.

CAPÍTULO 1 (Submetido)

**“IMMUNOREGULATORY MECHANISMS IN PERIPHERAL BLOOD
CELLS OF PATIENTS WITH MULTIPLE SCLEROSIS RECEIVING
TREATMENT WITH INTERFERON BETA”**

Cytokines secretion by Peripheral Blood cells of Patients with Multiple Sclerosis in treatment with Interferon beta.

Sandra R. Mirandola¹, Dannie E. M. Hallal-Longo¹, Alessandro S. Farias¹, Carlos O. Brandão¹, Benito P. Damasceno², and Leonilda M.B. Santos¹.

From the Neuroimmunology-Unit 1-Department of Microbiology and Immunology 2-Department of Neurology- Medical School - University of Campinas – UNICAMP – Campinas- SP-Brazil

Key words: Cytokines, Myelin Basic Protein, Autoimmunity

Running title: *Changes in the patterns of cytokines in relapsing and remitting MS treated with Interferon beta*

Address for correspondence: Leonilda M. B. Santos Ph.D. – Departamento de Microbiologia e Imunologia – Instituto de Biologia- UNICAMP- Campinas – SP- Brazil- CEP 13083-970 – FAX # 55.19. 37886276 Phone: 55.19.37886262.E mail: leonilda@unicamp.br

ABSTRACT

Immunotherapy with IFN β shows remarkable beneficial effects in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis (MS), although the mechanisms by which it exerts these beneficial effects remain poorly understood. Investigation was made of the effects of IFN β on proinflammatory and anti-inflammatory cytokine production in peripheral blood cells in MS patients, both untreated and those undergoing immunotherapy, as well as healthy controls.

Results show a significant increase in the production of proinflammatory cytokine such as TNF α and IFN γ in the plasma and in the supernatant of a leukocyte culture from MS patients with the untreated disease, whereas IFN β administration significantly reduces these levels, this was accompanied by a significant increase in the production of IL10 and a slight increase in that of TGF β .

This reduction in proinflammatory cytokine production in the treated MS patient group accompanied by a simultaneous increase in the production of anti-inflammatory cytokines, suggests that the beneficial effects of IFN β immunotherapy results, at least in part from the modulation of cytokine patterns.

INTRODUCTION

Multiple sclerosis (MS) is the most important demyelinating disease that affects man. Although we do not have information about the prevalence of MS in Brazil, specialists are concerned with the increasing incidence of this disease in southern areas of Brazil where the population are mainly descendents from European immigrants.

Multiple sclerosis is a chronic inflammatory disease characterized by lymphocyte infiltration and demyelination in the central nervous system ^[1]. Autoreactive T cells recognizing myelin components such as myelin basic protein (MBP) are thought to contribute to the pathogenesis of MS ^[2]. Although MS is a central nervous system (CNS) disease, myelin reactive T cells exist in an activated state in the peripheral blood and cerebrospinal fluid (CSF) of patients with MS ^[3]. Activated T lymphocytes also produce cytokines that modulates the immune response either positively or negatively.

In terms of treatment, immunotherapy with recombinant IFN β which is the first drug approved for use in the treatment of MS, shows remarkable beneficial effects in the relapsing-remitting form of the disease, leading to a reduction in both the severity and frequency of attacks ^[4,5]. Such clinical results have been confirmed by a significant reduction in the number of active scan and that of new lesions when subjected to magnetic resonance imaging ^[6]. The mechanisms of action underlying these beneficial effects of IFN β in MS, however, remain poorly understood, although they may be associated with the antagonizing effect of proinflammatory cytokines.

The investigation of the role of cytokines in autoimmune diseases has expanded rapidly over the past few years and there is now considerable evidence that cytokines such TNF α , IL12 and IFN γ contribute to the pathogenesis of MS. Therefore, the emergence of a Th2 type response results in the inhibition of Th1 differentiation and the down-regulation of the Th1-mediated immune response ^[7,8]. Significantly higher levels of TNF have been found in the CSF of patients with chronic progressive MS than in that of patients with a stable form of the disease ^[9]. The level of TNF α correlates with the degree of disability in patients with a progressive form of the disease ^[10], and it has been suggested that an increased production of TNF α precedes the clinical manifestation of a MS relapse ^[11].

There is also considerable evidence that IL-12 plays an essential role in the pathogenesis of multiple sclerosis and its animal model. The IL-12 receptor complex on T lymphocytes has been shown to be critical in Th1-mediated immunity and Th1 polarization, and promoting the synthesis of IFN γ ^[12-14]

In a clinical trial, IFN β has also been demonstrated showing that to enhance exacerbation frequency in MS patients ^[15] a phenomenon which may be associated with the activation of monocytes, as evidenced by the up-regulation of MHC class II antigen expression on these cells. ^[16] IFN β also stimulates the expression of adhesion molecules on endothelial cells, thus promoting T cell homing and activating blood-derived macrophages and astrocytes to produce proinflammatory mediators such as TNF α ^[17].

In inflammatory diseases, an increase in the production of cytokines with proinflammatory potential is accompanied by a concomitant increase in the production of cytokines with immunoregulatory properties such as IL 10 and TGF β ^[18-21]. IL 10 was initially identified as a factor produced by T helper 2 which inhibits the cytokine synthesis of Th1, an effect attributed to the inhibition of the accessory function, including down regulation of MHC class II expression, thus leading to impaired antigen presentation to reactive T cells ^[22].

Several studies also indicate that TGF β is a potent immunosuppressive factor, affecting proliferation, activation and differentiation of the cells that participated in immunity. Its use in the treatment of rats or mice ameliorates EAE ^[23], and its appearance in the CNS is related to recovery ^[24].

This research investigates the role of interferon β in the production of pro and anti-inflammatory cytokines in the peripheral blood of patients with MS.

MATERIALS AND METHODS

Patients: The patients in this study were evaluated, with the criteria of Poser et al. [25] used to define MS. A total of 49 patients with stable MS, 57 patients in treatment with IFN β 1b and 30 normal subjects were studied, and these individuals had a mean age of 31. The patients were ambulatory with Kurtzke's Expanded Disability Status Scale (EDSS) scores between 0 and 6.5, and had an MRI of the brain consistent with the diagnosis of MS. None of the patients, in any of the groups had received corticosteroids or other immunosuppressive drugs during a period of at least 6 months prior to donating blood for the study. The patients in the treated group had been receiving IFN β treatment for 6-24 months. This study was approved by the Ethics Committee of the Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP and the volunteers gave written informed consent for participation in the study.

Antigen, antibody and recombinant cytokines: Polyclonal chicken anti-TGF β 1 antibody was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA), purified bovine TGF- β 1 and monoclonal mouse anti-TGF β 1 were provided by Genzyme, MA, USA. Anti mouse IgG peroxidase (Vector Burlingame, CA – USA). Purified human TGF β (Sigma Chem. USA). The IL12, IFN γ , TNF α , IL10 were quantified using commercial kits from Pharmingen, San Diego, CA. Human Myelin Basic Protein was obtained according to Deibler et al. 1972 [26].

Capture ELISA for quantification of TGF β . TGF β was measured using a capture ELISA developed in our laboratory [27]. Antibody to TGF β (polyclonal antibody obtained from R&D, MN- USA) 1 μ g/ml in PBS, pH 7.4 was added to 96 well microtiter plates (Immulon I, Nunc, Roskilde, Denmark). After overnight incubation at 4°C, plates were washed three times with ELISA wash buffer (PBS containing 0.05% Tween 20) and blocked for 1 hr with ELISA diluent (PBS containing 0.05 % Tween 20, 1% BSA). Plates were washed three times with wash buffer, and 100 μ l of each standard, control, or sample was added to duplicate wells with overnight incubation at 4°C. The plates were washed three times with wash buffer and incubated for 1 hr at room temperature with monoclonal antibody (mAb) to TGF β (Genzyme – MA- USA) 1 μ g/ml in ELISA buffer. The plates were washed three times with ELISA wash buffer and incubated an additional hour with biotinylated anti-

mouse IgG (Vector, Burlingame, CA) 1:2000. Avidin-peroxidase complex and the substrate were then added. Orthophenylene diamine (Sigma Inc. USA) prepared at 0.5 mg/ml in 0.05 M hydrogen peroxide, was added for 30 min at room temperature and the plates read at 492 nm.

For quantification of IL 12, IFN γ , TNF α and IL10 we employed commercial kits for human cytokines according to the manufacturer (Biosource International Nivelles, Belgium). Briefly, 96-wells microtiter plates were coated with 1-2 μ g/ml of capture mAb of each cytokine in 0.1M NaHCO $_3$ (pH=8.5) at 4°C overnight. Following blocking with 3% dry milk in PBS at room temperature for 2 h, samples and standard recombinant IFN γ , TNF α , IL10 and IL 12 were added and incubated overnight at 4° C. Then, 0.5-2.0 μ g/ml of biotinylated detection mAb to human IL 12, IFN γ , TNF α , and IL10 and subsequently 1/400 avidin-peroxidase (Sigma Chem.- USA) was added and then the peroxidase substrate, and stop solution were used to obtain OD determined at 492 nm.

Statistical analysis: The statistical significance of the results was determined by a Kruskal Wallis test. A *p* value smaller than 0.05 was considered to be significant.

RESULTS

Production of IL12 by peripheral blood cells of MS patients with treated or not with IFN β and healthy controls. IL12 was quantified in the plasma using an ELISA assay. A mean in the supernatant was 446.2 ± 56.9 pg/ml for treated MS patients (n=50), with 552.4 ± 116.1 pg/ml for the untreated MS group (n=27) and 231.2 ± 32.4 pg/ml for the healthy controls (n=31) this level was significantly higher for both groups of MS patients (p=0.01) (Figure 1).

IFN γ production by whole peripheral blood cells Mononuclear cells were stimulated for 60 h with PHA (10 μ g/ml) or MBP (25 μ g/ml), or left unstimulated for quantification of IFN γ level in the supernatant. For unstimulated *in vitro* cells (Figure 2A), the mean production of IFN γ in the supernatant of the two MS groups was 113.7 ± 13.7 pg/ml for treated MS (n=20) and 56.9 ± 13.0 pg/ml for healthy controls (n=20), showing a significant difference (p=0.004) between the two groups. In the supernatants from untreated MS (n=19) the mean was 258.8 ± 38.5 pg/ml versus 56.9 ± 13.0 pg/ml for healthy controls. Both MS group showed a significant increase in IFN γ over that of the healthy controls (p<0.001).

For assay using nonspecific mitogen (PHA), 23 patients treated with IFN β , 26 untreated patients and 20 healthy controls were studied, with a mean level of IFN γ of 2663.6 ± 237.0 pg/ml for treated MS and 2138.3 ± 220.0 pg/ml for healthy subjects with non-significant difference (p>0.05) between the treated and healthy subjects. In untreated group, however, the mean of 3239.5 ± 173.7 pg/ml was significantly greater than that of the healthy controls 2138.3 ± 220.0 pg/ml (p>0.05) (p=0.002) (Figure 2B).

When the mononuclear cells were stimulated with MBP, the levels of IFN γ were 824.5 ± 75.3 pg/ml (treated MS) (n=15) 507.3 ± 72.0 pg/ml (healthy subjects) (n=15) and 1922.0 ± 335.0 pg/ml (n=15) (untreated MS). The production of IFN γ was significantly higher in the untreated group than in the control (p=0.002), but not in the treated group (p>0.05) (Figure 2C).

TNF α production in peripheral blood cells of MS patients with or without treatment with IFN β . TNF α levels produced by whole blood cells, both with or without *in vitro* stimulation with LPS were quantified in the plasma, using an ELISA assay. For cells cultured without *in vitro* stimulation the mean of TNF α was 4039.2 ± 608.1 pg/ml (treated MS group; n=19), 978.6 ± 282.8 pg/ml (healthy subjects; n=19) and 9483.0 ± 1072 pg/ml (untreated MS; n=19). TNF α production was significantly greater in both treated and untreated MS groups than in the healthy controls ($p=0.0001$). The difference between treated and untreated MS patients was also significant ($p=0.001$) (Figure 3A).

TNF α was also quantified in the plasma of cells previously stimulated with LPS, with values of 6137.1 ± 817.0 (treated MS; n=23), 24760.0 ± 3189.0 pg/ml (untreated MS; n=23) and 4723.0 ± 736.5 pg/ml (healthy subjects; n=22). Although the level in the treated group was not significantly different than that of the healthy controls ($p>0.05$), for the untreated group the increase was significant ($p=0.001$) (Figure 3B).

IL10 production IL10 levels from mononuclear cells, both with and without stimulation with PHA or MBP for 40 h, were quantified by a capture ELISA assay. When the mononuclear cells were cultured neither antigen nor mitogen, the mean IL 10 production in the treated group (n=50; $p<0.0001$) was 115.8 ± 6.3 pg/ml, a significant increase over the 73.7 ± 8.0 pg/ml of the healthy controls (n=22). For the untreated group (n=30) there was significant decrease ($p=0.002$) to 41.2 ± 3.5 pg/ml (Figure 4A).

After *in vitro* PHA stimulation, the mean of IL-10 production was 166.9 ± 11.6 pg/ml (treated MS group; n=41), 153.1 ± 13.9 pg/ml (untreated MS; n=28), and 151.8 ± 9.3 pg/ml (healthy controls; n=39). These differences were not significant ($p>0.05$) (Figure 4B).

In vitro stimulation with MBP (25 μ g/ml) however led to the mean levels of IL 10 of 264.5 ± 30.0 pg/ml and 140.6 ± 21.8 pg/ml for the treated MS group; (n=23) and untreated MS patients (n=23), respectively both significantly greater than 93.7 ± 17.1 pg/ml of the 22 healthy controls ($p<0.001$ and 0.04, respectively) (Figure 4C).

Production of TGFβ in mononuclear cells The TGFβ level in cells with and without stimulation with PHA for 72 h was quantified by a capture ELISA assay. The analysis of the supernatant of unstimulated cells showed no significant difference between the three groups of individuals: 67.1 ± 4.8 pg/ml (treated MS; n=10); 64.2 ± 6.9 pg/ml (untreated; n=19), and 65.9 ± 11.0 pg/ml (healthy controls; n=13) ($p>0.05$) (Figure 5A).

After stimulation, however, these levels increased to 2763.0 ± 324 pg/ml (treated MS; n=32), 2660.5 ± 52.0 pg/ml (untreated MS; n=33); and 2485.0 ± 92.4 pg/ml (healthy controls, n=27) the increase for the treated MS group was significant ($p<0.01$), but not for the untreated group ($p>0.05$) (Figure 5B)

DISCUSSION

Our data have demonstrated that there are changes in the cytokines secretion patterns of peripheral blood cells of patients with MS treated with interferon β . Although there is a localized immune response within the CNS in these patients, immune abnormalities correlated with disease activity are also found in the peripheral immune compartment ^[3,22]. Although Th1 and Th2 cells are the major sources of their respective cytokines, many others cells within and outside the immune system also produce these cytokines, contributing to an overall Th1 and Th2 cytokine pattern. Therefore, we chose to work with whole leukocytes from the peripheral blood.

IL-12 is considered a critical proinflammatory cytokine in multiple sclerosis, as well as in its animal model, experimental autoimmune encephalomyelitis. Herein, an increase of the production of this cytokine was observed in the serum of both treated and untreated MS patients in relation to healthy controls. A similar increase was observed in progressive multiple sclerosis ^[12-14], and increased frequencies of IL-12-secreting monocytes appear to correlate with active brain lesions detected by magnetic resonance imaging ^[28]. However, no reduction in IL12 level after IFN β treatment was found here, in contrast with previous findings ^[29].

Instead, the production of IFN γ increase significantly in the supernatant of leukocytes, whether unstimulated or stimulated with PHA or MBP. Interferons were initially tested as therapeutic agents for MS because of their antiviral properties and the possibility that MS was due to persistent viral infection. However, a pathogenic role for MS patients who received recombinant IFN β has previously been described (15). One plausible hypothesis for the mechanism of IFN β efficacy in MS would be that IFN β stimulates the expression of soluble cytokines with immunosuppressive properties. The study reported here shows that the administration of IFN β leads to a significant reduction in IFN γ whether or not the cells have been stimulated with nonspecific mitogen or neuroantigen. This data is in agreement with previous reports showing that immunotherapy with IFN β significantly reduces the effects of this proinflammatory cytokine ^[30-32].

In this paper a significant increase in the production of TNF α was demonstrated whether or not peripheral blood cells from treated patients were stimulated *in vitro* with LPS. These data are in agreement with those authors who demonstrated an increase in TNF α in patients with active MS ^[33,34]. Since TNF α is a major inducer of endothelial adhesion molecules and chemokines, it could be that TNF α has a major effect on the recruitment of lymphocytes to the central nervous system ^[17]. Studies describing the spontaneous development of a chronic inflammatory demyelinating disease in transgenic mice that constitutively express a deregulate murine TNF α gene. Transgene expression was restricted to the central nervous system and the direct involvement of the TNF α in the pathogenesis of the disease was confirmed by peripheral administration of neutralizing murine TNF α antibodies ^[35]. We clearly demonstrated that the level of TNF α was decreased significantly in the group of MS patients treated with IFN β whether with or without LPS stimulation, a beneficial effect of IFN β which has previously reported ^[35,37].

The characteristic cytokine products of Th1 or Th2 are mutually inhibitory for the differentiation and effector functions of the reciprocal phenotype ^[9]. IFN γ has been shown to prevent Th2 cell proliferation, whereas IL10 profoundly inhibits the synthesis of Th1 cytokines ^[38]. Of note is the observation here that myelin antigens stimulate the production of IL10 by cells from patients with treated MS. Production of anti-inflammatory cytokines by T cell clones sensitized to PLP from MS patients has also been previously observed ^[39,40]. It was demonstrated that distinct suppressor determinants exist on the MBP molecule which preferentially stimulates the production of suppressive cytokines, such as TGF β ^[41]. Another previous study also established IFN β induced accumulation of IL10 messenger RNA and protein secretion *in vitro* and *in vivo* ^[42]. It is possible that suppressive determinants present on the MBP molecule may promote, in synergism with IFN β , the production of IL10 by the cells from treated patients whereas, in the untreated disease these cells are absent or have a level of low function. In this study increased levels of IL10 were detected, although the increase in TGF β production after treatment with IFN β was minimal; these findings match those of a previous study ^[42] and are in disagreement with others ^[3,43-45]. The increase in TGF β , even at moderate levels, reinforces the hypothesis of the suppressive effect this cytokine in EAE and MS ^[40,41].

Taken together, this paper presents evidence of a significant increase in the production of $\text{TNF}\alpha$ and $\text{IFN}\gamma$ in the peripheral blood cells of patients with untreated MS, accompanied by a significant reduction of these cytokines in the treated MS group. The reduction in the production of proinflammatory cytokines in this group was accompanied by an increase in the production of IL-10 by the cells in these same individuals, an observation which emphasizes the immunoregulatory properties of $\text{IFN}\beta$. Consequently, a therapeutic approach which is favorable to the production of anti-inflammatory cytokines such as immunotherapy with $\text{IFN}\beta$ should be used to interrupt the cascade of events leading to chronic inflammation.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to acknowledge the financial support from FAPESP (grant 00/07703-7); CNPq (grant 300375/84-87) and FAEP-UNICAMP; the collaboration of Linda Gentry El-Dash in the linguistic revision of the manuscript and of Gislaine C. L. Brito and Jose R. Duque Estrada for the technical assistance provided.

REFERENCES

- [1] Steinman L. (1996) "Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system". *Cell*, **85**: 299-302.
- [2] Ota, K., Matsui, M., Milford, E.L., Mackin, G.A., Weiner, H.L. and Hafler, D.A. (1990). "T cell recognition of an immunodominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis". *Nature*, **346**:183-187.
- [3] Hafler, D. A. and Weiner, H.L. (1989). "MS: a CNS and systemic autoimmune disease" *Immunol Today*, **10**: 104-107.
- [4] Jacobs, L.D., Cookfair, D.L., Rudick, R.A., Herndon, R.M., Richert, J.R., Salazar, A.M., et al. (1996) "Intramuscular Interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis". *Ann. Neurol*, **39**: 285-294.
- [5] PRISM. (1998) "Randomised double-blind placebo-controlled study of interferon beta 1a PRISMS (Prevention of relapses and disability by interferon beta 1a subcutaneously in Multiple sclerosis) Study group". *Lancet*, **352**:1491-1497.
- [6] Paty, D.W. and Li, D.K. (1993) "Interferon beta 1b is effective in relapsing – remitting multiple sclerosis. II MRI analysis of results of a multicenter, randomized, double-blind, and placebo controlled trial." UBC MS/MRI Study Group and the IFN β Multiple Sclerosis Study Group". *Neurology*, **43**:662-667.
- [7] PRISMS-4 (2001) "Long-term efficacy of interferon-beta 1a in relapsing MS". *Neurology*, **56**:1628-1636.
- [8] Navikas, V. and Link, H. (1996) "Cytokines and the pathogenesis of multiple sclerosis". *J. Neurosc Res.*, **45**:322-333.
- [9] Nicholson, L. B. and Kuchroo, V. K. (1996) "Manipulation of the Th1/Th2 balance in autoimmune disease". *Cur. Opin. Immunol*, **8**: 837-842.

- [10] Rieckmann, P., Albrecht, M., Kitze, B., Weber, T., Tumani, H., Broocks, A., et al., (1994). "Tumor necrosis factor messenger RNA expression in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is associated with disease activity". *Ann. Neurol.*, **37**:227-257.
- [11] Choffon, M., Jillard, C., Gauthier, G., and Grau, G.E. (1992) "Tumor necrosis factor production as possible predictor of relapse in patients with multiple sclerosis." *Eur. Cytokine Netw.*, **433**:523-531.
- [12] Segal, B.M., Dwyer, B.K., and Shevach, E.M. (1998) "An interleukin (IL-10/IL-12) immunoregulatory circuit controls susceptibility to autoimmune disease". *J. Exp. Med.*, **187**:537-546.
- [13] Comabella, M., Balashov, K., Issazadeh, S., Smith, D., Weiner, H.L. and Khoury, S.J. (1998). "Elevated interleukin-12 in progressive multiple sclerosis correlates with disease activity and is normalized by pulse cyclophosphamide therapy". *J. Clin. Invest.*, **102**:671-678.
- [14] Balashov, K.E., Smith D.R., Khoury, J.S., Hafler, D.A. and Weiner, H.L. (1997) "Increased interleukin 12 production in progressive multiple sclerosis: induction by activated CD4T cells via CD40 ligand." *Proc.Natl. Acad. Sci USA*, **94**:599-603.
- [15] Panitch, H.S., Hirsch, R.L., Schindler, J. and Johnson, K.P. (1987) "Treatment of multiple sclerosis with gamma interferon: exacerbations associated with activation of the immune system". *Neurology*, **37**:1097-1102.
- [16] Dettke, M., Scheidt, P., Prange, H. and Kirchner, H. (1997) "Correlation between interferon production and clinical disease activity in patients with multiple sclerosis". *J. Clin Immunol.*, **17**:293-300.
- [17] Hartung, H.P., Reiners, K., Archelos, J.J., Michels, M., Seeltrayers, P., Heidenreich, F., et al., (1995). "Circulating adhesion molecules and tumor necrosis factor in multiple sclerosis: Correlation with magnetic resonance imaging." *Ann .Neurol.*, **38**:186-193.

- [18] Mosmann, T.R. and Sad, S. (1996) "The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more". *Immunol Today*, **138**: 138-146.
- [19] Zang, I., Hong, J., Robinson, R., Li, S., Rivera, V.M. and Zhang, J.Z. (2003). "Immune regulatory properties and interactions of copolymer-I and beta-interferon 1a in multiple sclerosis" *J. Neuroimmunol*, **137**:144-153.
- [20] De Waals Malefyt, R., Abrams, J., Bennet, B., Figdor, C.G. and de Vries, J.E. (1991). "Interleukin-10 inhibits cytokines synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes". *J. Exp. Med.*, **174**: 1209-1220.
- [21] Kennedy, M.K., Torrence, D.S., Pichia, K.S. and Mohler, K.M. (1992) "Analysis of cytokine mRNA expression in the central nervous system of mice with Experimental Autoimmune Encephalomyelitis reveals that IL-10 mRNA expression correlates with recovery". *J. Immunol.*, **149**:2496-2505.
- [22] Costa, P. M., Yasuda, C.L., Scagliusi, S.M., Diaz-Bardales, B.M., Maciel, E., Damasceno, B.P., et. al., (2000). "Pattern of Cytokines Secretion by peripheral blood cells of patients with Multiple Sclerosis in Brazil". *Multiple sclerosis*, **6**:293-299.
- [23] Johns, L.D., Flanders, K.C.; Ranges, G.E. and Sriram, S. (1991) "Successful treatment of experimental allergic encephalomyelitis by transforming growth factor β 1" *J. Immunol*, **147**:1792-1796.
- [24] Khoury, S.J., Hancock, W.W. and Weiner, H.L. (1992) "Oral tolerance to myelin basic protein and natural recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis are associated with downregulation of inflammatory cytokines and differential upregulation of Transforming Growth Factor β , Interleukin4, and Prostaglandin E expression in the brain". *J. Exp Med*, **176**:1344-1364.
- [25] Poser, C. M., Paty, D. W., Scheinberg, L., McDonald, W.I., Davis, F.A., Ebers, G.C., et. al., (1983) "New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols". *Ann. Neurol.*, **13**:227-231.

- [26] Deibler, G.E., Martenson, R.E. and Kies, M.W.(1972) "Large scale preparation of Myelin Basic Protein from central nervous tissue of several mammalian species". *Prep. Biochemistry*, **2**: 139-165.
- [27] Santos, L.M.B., Al-Sabbagh, A., Londono, A. And Weiner, H.L. (1994) "Oral tolerance to myelin basic protein induces regulatory TGF β secreting T cells in Peyer's patches of SJL mice". *Cell. Immunol.*, **157**: 439-447.
- [28] Makhoulf, K., Weiner, H.L., and Khoury, S.J., (2001) "Increased percentage of IL-12+ monocytes in the blood correlates with the presence of active MRI lesions in MS" *J. Neuroimmunol.*, **119**:145-149.
- [29] Karp, C.L., Biron, C.A., and Irani, D.N. (2000) "Interferon beta in multiple sclerosis: is IL-12 suppression the key". *Immunol Today*, **21**:24-28.
- [30] Brod, S.A., Marshall, G.D.Jr., Henninger, E.M., Sriram, S., Khan, M. and Wolinsky, J.S. (1996) "Interferon beta 1b treatment decreases tumor necrosis factor α and increases interleukin 6 production in multiple sclerosis" *Neurology*, **46**:1633-1638.
- [31] Yasuda, C.L., Al-Sabbagh, A., Oliveira, E.C., Diaz-Bardales, B.M., Garcia, A.A. and Santos, L.M. (1999) "Interferon beta modulates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by altering the pattern of cytokine secretion". *Immunol. Investigations*, **28**:115-126.
- [32] Petereit, H.F., Bamborschke, S., Esse, A.D. and Heiss, W.D. (1997) "Interferon gamma producing blood lymphocytes are decreased by interferon beta therapy in patients with multiple sclerosis". *Multiple sclerosis*, **3**:180-183.
- [33] Musette, P., Benveniste, O., Lim, A., Bequet, D., Kourilsky, P., Dormont, D., et. al., (1996) "The pattern of production of cytokine mRNA is markedly altered at the onset of multiple sclerosis." *Res. Immunol.*, **147**:435-441.

- [34] Sharief, M. K. and Hentges, R. (1991) "Association between tumor necrosis factor α and disease progression in patients with multiple sclerosis". *N. Engl. J. Med.*, **325**: 467-472.
- [35] Probert, L., Akassoghoulou, K., Pasparakis, M., Kontogeorgos, G. and Kollias, G. (1995) "Spontaneous inflammatory demyelinating disease in transgenic mice showing central nervous system-specific expression of tumor necrosis factor alpha." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**:11294-11298.
- [36] Ozenci, V., Kouwenhoven, M., Huang, Y.M., Kivisakk, P. and Link, H. (2000) "Multiple sclerosis is associated with an imbalance between tumour necrosis factor-alpha (TNF alpha) and IL-10 secreting blood cells that is corrected by interferon -beta (IFN-beta)" *Clin. Exp. Immunol.*, **120**:147-153.
- [37] Scarchielli, P., Critelli, A., Greco, L., Sokola, E., Floridi, A. and Gallai, V. (2001) "Expression of TNF-alpha mRNA by peripheral blood mononuclear cells of multiple sclerosis patients treated with IFN-beta 1A". *Cytokine*, **14**:294-298.
- [38] D'Orazio, T. J. and Niederkorn, J. Y. (1998) "A novel role of TGF β and IL 10 in the induction of immune privilege". *J. Immunol.*, **160**:2989-2998.
- [39] Chen, Y., Kuchroo, V. K., Inobe, J. I., Hafler, D.A. and Weiner, H.L. (1994) "Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis". *Science*, **265**:1237-1240.
- [40] Correale, J., Gilmore, W., McMillan, M., Li S, McCarthy, K., Le, T., et. al., (1995) "Patterns of cytokine secretion by autoreactive proteolipid protein specific T cell clones during the course of multiple sclerosis". *J. Immunol.*, **154**:2959-2968.
- [41] Miller, A., Al-Sabbagh, A., Santos, L.M.B., Das, M.P. and Weiner, H.L. (1993) "Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both *in vitro* and *in vivo* immune responses by the release of transforming growth factor β after antigen-specific triggering". *J. Immunol.*, **151**:7307-7315.

- [42] Rudick, R.A., Ransohoff, R.M, Pepler, R., VanderBrug Medendorp, S., Lehmann, P. and Alam, J. (1993) "Interferon beta induces Interleukin -10 expression: Relevance to Multiple Sclerosis". *Ann Neurol.*, **40**:618-627.
- [43] Gayo, A., Mozo, L., Suarez, A., Tunon, A., Lahoz, C. and Gutierrez, C. (2000) "Long-term effect of IFN β 1b treatment on the spontaneous and induced expression of IL10 and TGF β 1 in MS patients". *J. Neurol. Science*, **179**:43-49.
- [44] Chabot, S., and Yong, V.W. (2000) "Interferon beta 1b increases interleukin 10 in a model of T cell-microglia interaction. Relevance to MS." *Neurology*, **55**:1497-1505.
- [45] Nicoletti, F., Di Marco, R., Patti, F., Reggio, E., Nicoletti, A., Zaccane, P., et. al., (1998) "Blood levels of transforming growth factor beta 1 (TGF β 1) are elevated in both relapsing-remitting and chronic progressive multiple sclerosis (MS) patients and are further augmented by treatment with interferon beta. (IFN β 1b)" *Clin. Exp Immunol.*, **113**:96-99.

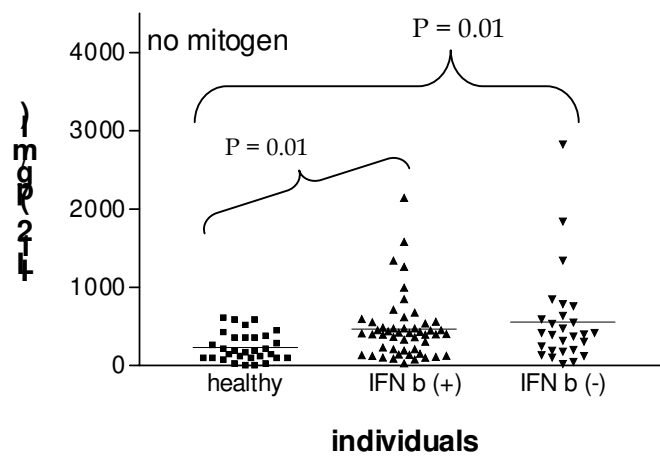


Figure 1

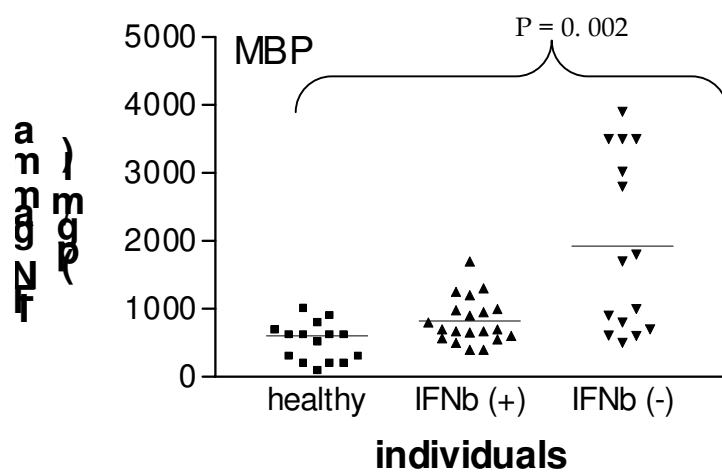
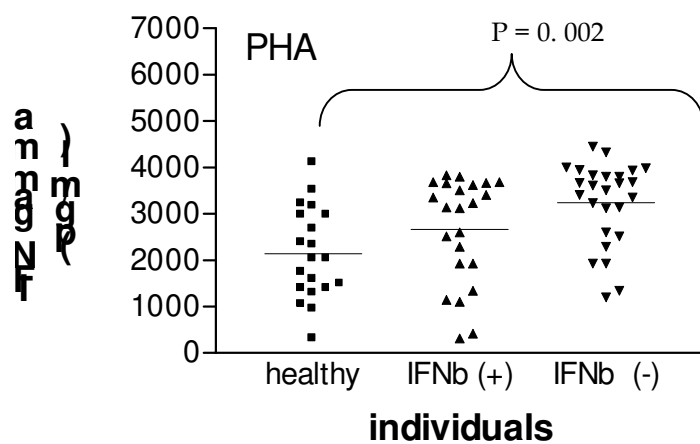
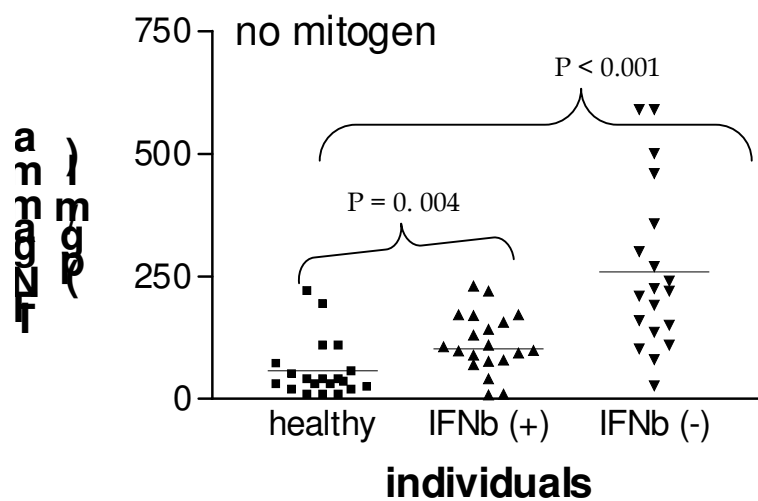


Figure 2

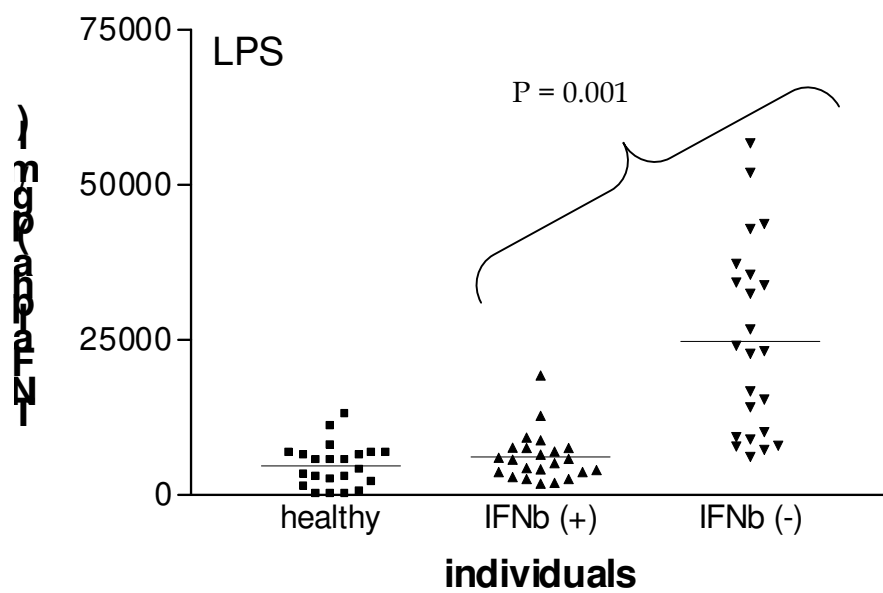
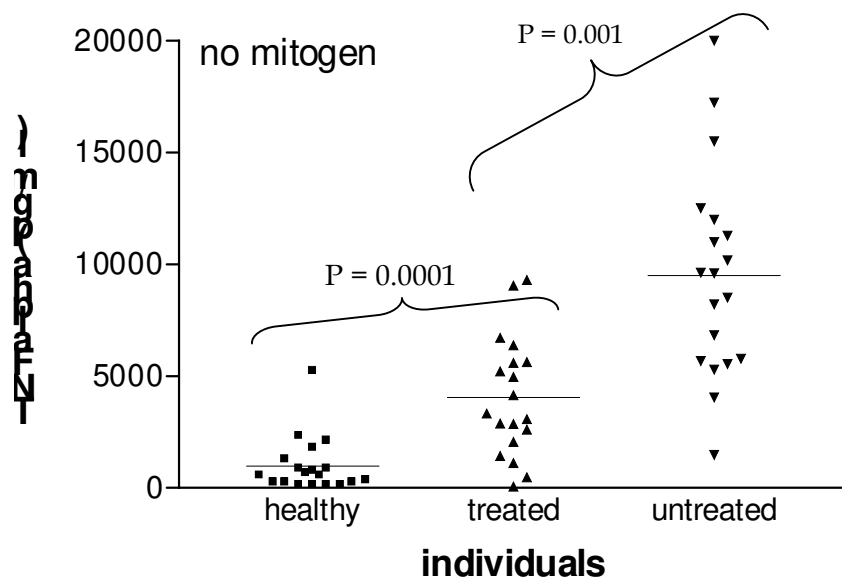


Figure 3

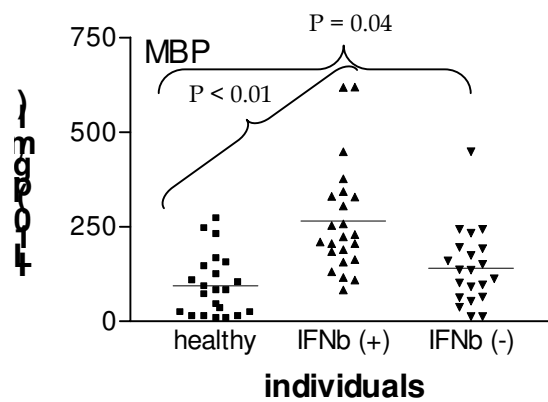
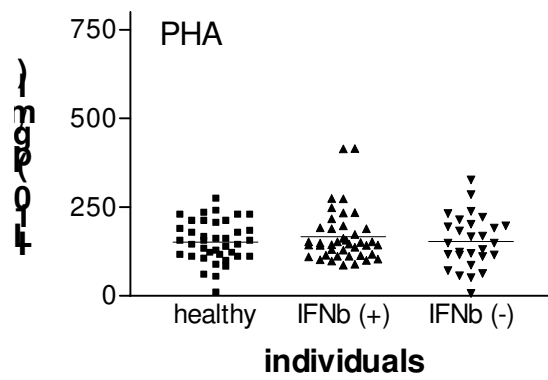
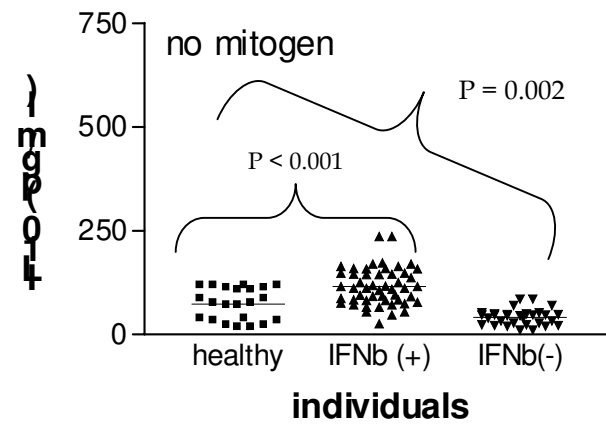


Figure 4

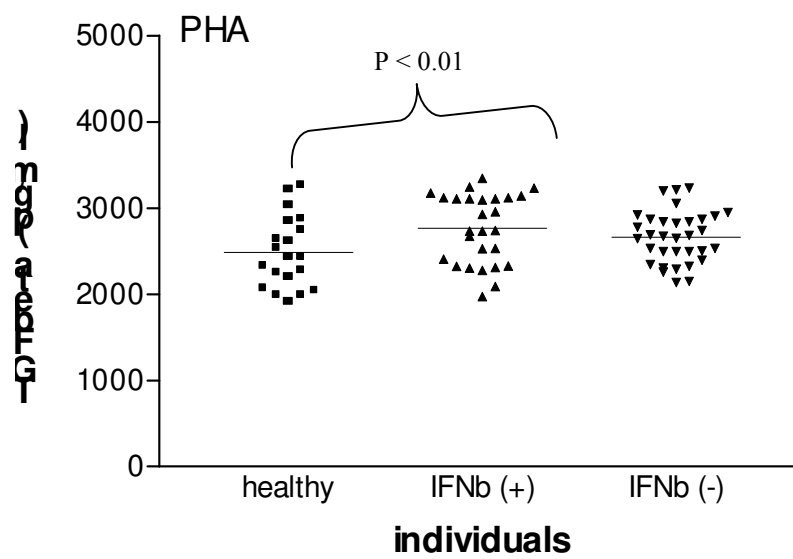
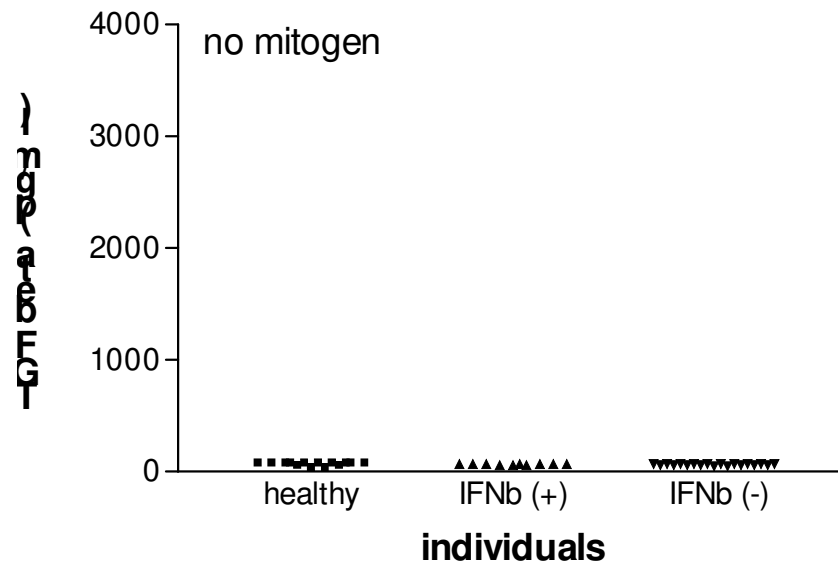


Figure 5

Figure legends

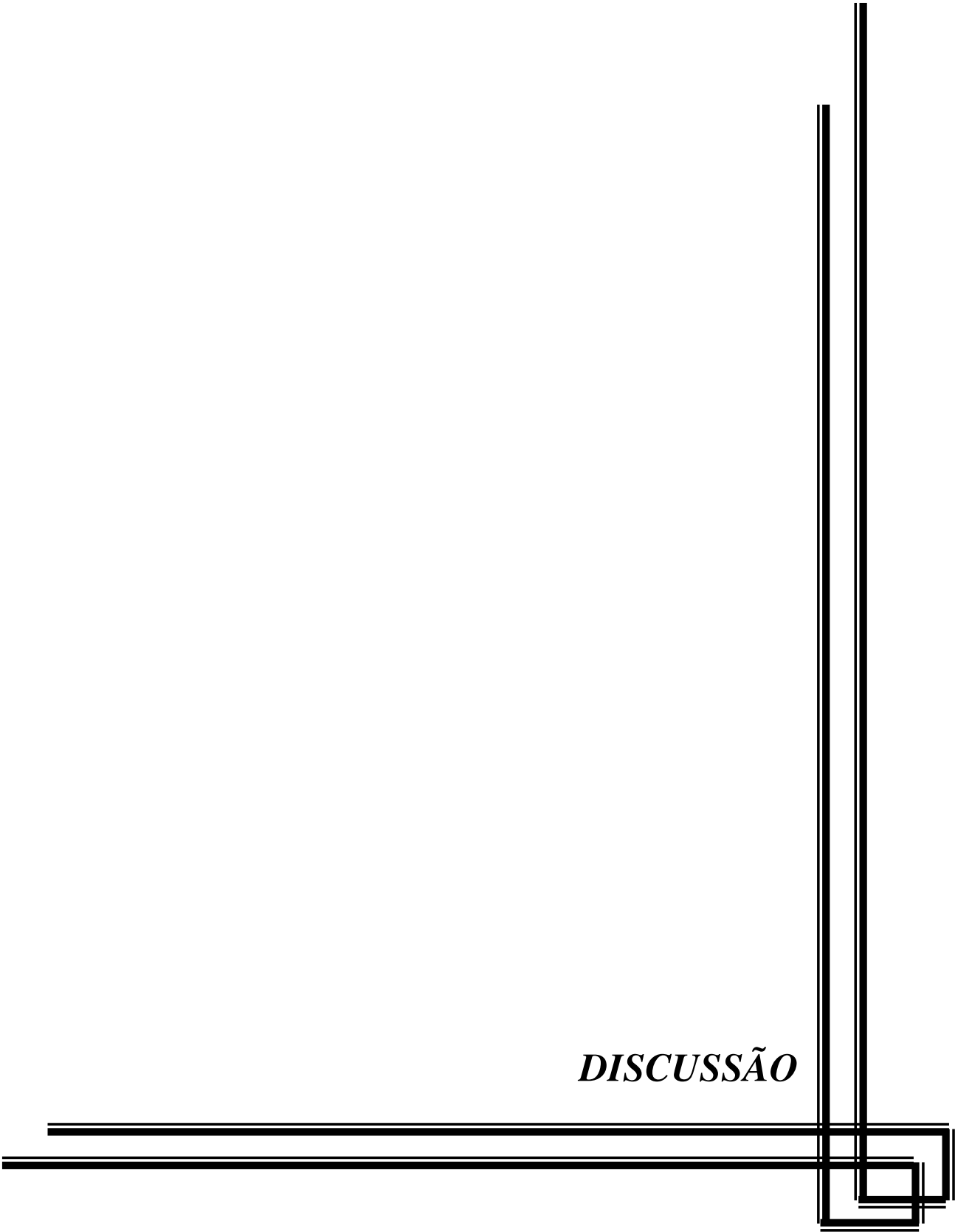
Figure 1. *Production of IL12 by MS patients treated with IFN β untreated and healthy controls.* Plasma from the three groups of individuals were collected and the IL12 concentration were detected by ELISA.

Figure 2. *Production of IFN γ by MS patients with MS treated with IFN β , untreated and healthy controls .* Leukocytes were cultured without antigen (a) stimulated *in vitro* with PHA (10 μ g/ml) (b) or MBP (25 μ g/ml) (c) and IFN γ were detected by ELISA in supernatants from 60 h culture. Net results, results from stimulated cells minus results from unstimulated cells.

Figure 3. *Production of TNF α by MS patients treated with IFN γ untreated and healthy controls.* Whole peripheral blood cells were stimulated with LPS (100 ng/ml) for 2h and TNF α concentration were detected by ELISA. Net results, results from stimulated cells minus results for unstimulated cells.

Figure 4. *Production of IL-10 by MS patients treated with IFN β , untreated and healthy controls.* Leukocytes were cultured without mitogen (a) stimulated with PHA (10 μ g/ml) (b) or MBP (25 μ g/ml) (c) and IL-10 were detected by ELISA in the supernatants from 40 h culture. Net results, results from stimulated cells minus results from unstimulated cells.

Figure 5. *Production of TGF β by MS patients treated with IFN β untreated and healthy controls.* Leukocytes were cultured without antigen (a) and were stimulated with PHA (10 μ g/ml) (b). TGF β were detected by ELISA in the supernatants from 72 h culture. Net results, results from stimulated cells minus results from unstimulated cells.



DISCUSSÃO

O presente trabalho visou quantificar as citocinas, com efeito pró-inflamatório (TNF α , IFN γ e IL12) e anti-inflamatório (IL10 e TGF β), produzidas por células do sangue periférico de pacientes portadores de Esclerose Múltipla. A EM é uma doença inflamatória, de caráter auto-imune, compartimentalizada no SNC. No entanto, esta doença pode ser considerada sistêmica, diante de inúmeras alterações imunológicas observadas também no sangue periférico (HAFLER e WEINER, 1989), o que justifica o fato de termos estudado leucócitos do sangue periférico. Isso também se deve ao fato de que, embora linfócitos TH1 e TH2/TH3 serem os maiores produtores das citocinas pró e anti-inflamatórias, respectivamente, outros leucócitos também contribuem na síntese dessas citocinas.

Os fatores que influenciam a polarização da síntese de citocinas com efeito pró ou anti-inflamatórios não estão totalmente conhecidos. Sabe-se que citocinas presentes no microambiente de diferenciação dos linfócitos influenciam na maturação do subtipo TH1 ou TH2. A IL12 está envolvida na diferenciação dos clones TH1, produtores de IFN γ (ROMAGNANI *et al.*, 1995).

No presente trabalho, foi observado aumento na síntese de IL12 no soro de pacientes com EM tanto tratados, como não tratados com o IFN beta, sendo que não houve diferença significativa na síntese dessa citocina, após o tratamento. O aumento da produção de IL12 está de acordo com observações anteriores que demonstram níveis elevados de IL12 em indivíduos com EM, na fase ativa da doença (COMABELLA *et al.*, 1998), sendo que esse aumento foi positivamente correlacionado com o aumento das lesões desmielinizantes, detectadas por MRI. Embora vários pesquisadores tenham demonstrado redução de IL12 no sangue periférico dos pacientes após o tratamento com o IFN β , em nosso laboratório não foi possível a confirmação desses dados (KARP *et al.*, 2000), mesmo tendo sido utilizada técnica de ELISA com alta sensibilidade para a citocina.

Em relação à produção de IFN γ , nossos dados mostram, claramente, o aumento da síntese desta citocina no sobrenadante de leucócitos de pacientes não tratados com IFN β , estimulados ou não, com MBP ou PHA. Esses dados confirmam a participação ativa do IFN γ na reação inflamatória, que resulta na desmielinização. Essa citocina aumenta a expressão de antígenos MHC de classe II na superfície de células apresentadoras de

antígenos do SNC que normalmente não expressam essas moléculas, resultando na ativação dos linfócitos encefalitogênicos ou citotóxicos. O IFN γ induz, ainda, a liberação de proteases, pelos macrófagos, que degradam as proteínas componentes da mielina, além de aumentar a expressão de moléculas de adesão, que regulam a migração de linfócitos para os sítios da inflamação, facilitando a entrada destas células inflamatórias no SNC. Nossos dados mostram que o tratamento com o IFN β reduziu, significativamente, a síntese de IFN γ pelas células dos pacientes. Esses dados estão de acordo com dados da literatura que mostraram que, a imunoterapia com IFN β , reduz consideravelmente os efeitos desta citocina pró-inflamatória (PETEREIT *et al.*, 1996). Em trabalho realizado em nosso laboratório, no modelo da EAE, foi demonstrado que o tratamento com IFN β reduz a gravidade da doença, acompanhado de diminuição dos níveis de IFN γ (YASUDA *et al.*, 1996). A competição pelos receptores de IFN γ nas células, é um dos possíveis mecanismos que explicam a ação do IFN β (GOODKIN *et al.*, 2001), assim como, o aumento das citocinas com efeito anti-inflamatório que, por sua vez, levam à redução da síntese de citocinas pró-inflamatórias.

Com relação à síntese de TNF α , nossos dados mostram um aumento considerável na liberação espontânea dessa citocina, pelas células do sangue periférico de pacientes tratados e não tratados, quando se observou a liberação espontânea e maior produção no grupo de pacientes não tratados, quando os leucócitos foram ativados com LPS. Os macrófagos são os maiores produtores do TNF α , embora também possa ser produzida por linfócitos, sendo que o LPS é um potente ativador da síntese dessa citocina. Os dados apresentados confirmam a participação importante do TNF α na EM. O TNF α potencializa as reações inflamatórias na EM, pois age ativamente no recrutamento de macrófagos para o local da lesão e estes promovem a destruição tecidual. O direto efeito mielínolítico do TNF α foi demonstrado em cultura (SELMAJ *et al.*, 1998). Além disso, o TNF α é o maior indutor da expressão de moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1 sobre as células endoteliais, que facilitam a passagem das células inflamatórias, rompendo, dessa forma, a barreira hemato-encefálica. O tratamento com o IFN β , induziu uma significativa redução na síntese dessa citocina, quando se comparou ao grupo de pacientes não tratados, principalmente nos ensaios onde os leucócitos foram estimulados com o LPS. Esses dados

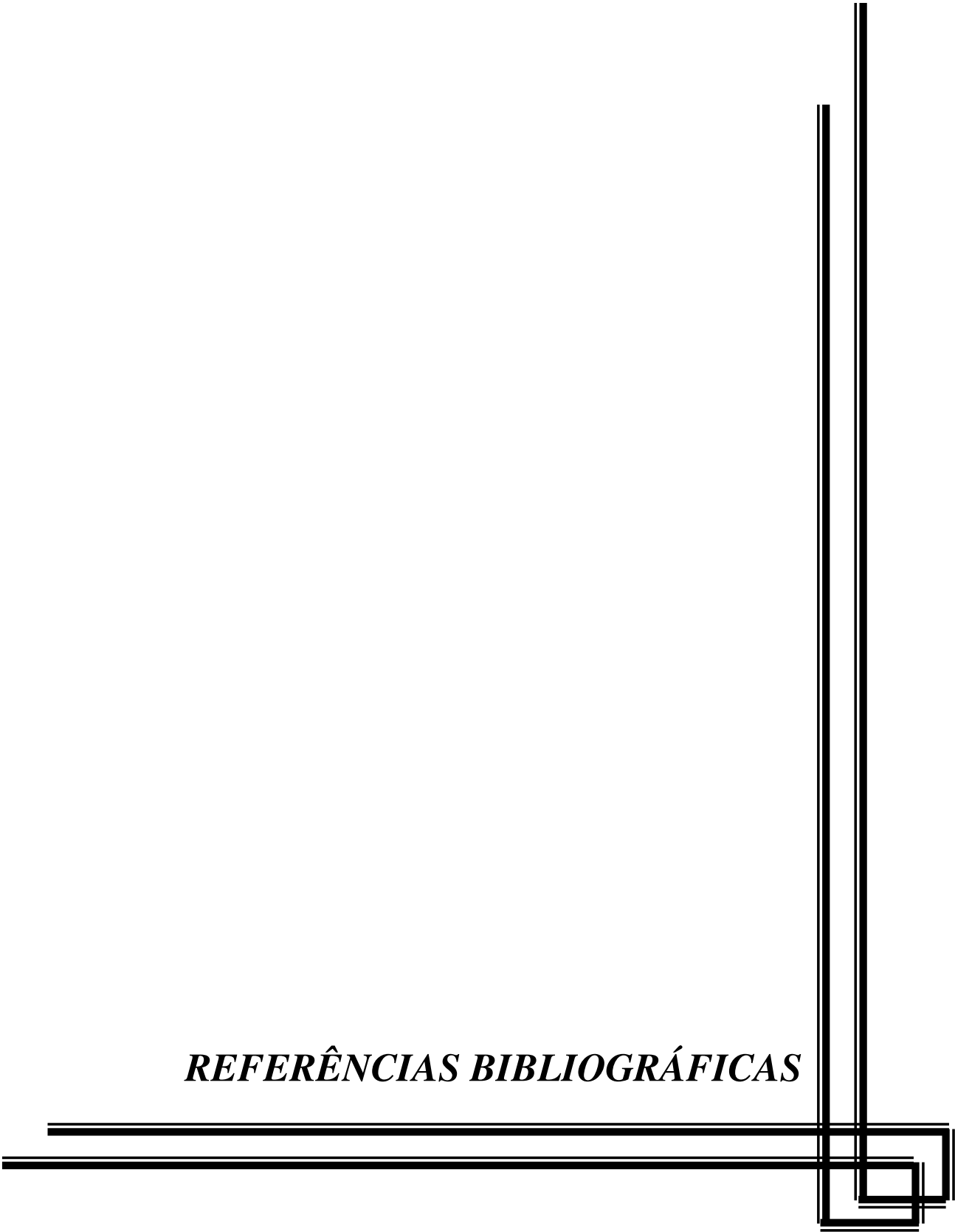
estão em acordo com trabalhos previamente realizados, e acredita-se que o aumento na síntese de citocinas anti-inflamatórias, causada pelo tratamento, seja responsável pela redução da síntese de $\text{TNF}\alpha$.

As citocinas anti-inflamatórias, como a IL 10 e $\text{TGF}\beta$, têm a função de antagonizar os efeitos das citocinas pró-inflamatórias. Na EM, foi demonstrado o predomínio da síntese de citocinas pró-inflamatórias, durante a fase ativa da doença, enquanto as citocinas anti-inflamatórias aumentavam durante a fase de remissão da doença (COSTA et al., 2000). No presente trabalho, o tratamento com o $\text{IFN}\beta$ induziu um aumento potencial dos níveis de IL10 no grupo de pacientes tratados e discreto, da produção de $\text{TGF}\beta$. O aumento da síntese de IL10 e $\text{TGF}\beta$ tem sido, positivamente correlacionado com a redução da gravidade dos processos desmielinizantes, observados tanto no modelo experimental (YASUDA et al. 1999) como na EM (RUDICK et al., 1996), provavelmente, pela propriedade dessas citocinas interferirem na síntese das citocinas pró-inflamatórias.

Resumindo, esse estudo mostra um significativo aumento da produção de $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IFN}\gamma$, pelas células do sangue periférico de pacientes portadores de EM não tratados com $\text{IFN}\beta$, com redução significativa destas citocinas no grupo de pacientes em tratamento. A redução na produção de citocinas inflamatórias no grupo de pacientes tratados, provavelmente se deve ao aumento da produção de IL10 e $\text{TGF}\beta$. Esses dados confirmam o efeito imunomodulador dessa abordagem terapêutica e, juntamente com o acompanhamento clínico dos doentes, vem contribuir para o entendimento dos eventos envolvidos na cascata inflamatória que leva a desmielinização.

CONCLUSÃO

O tratamento com IFN β resultou na inibição da síntese do TNF α e IFN γ , com simultâneo aumento da produção de IL10 e TGF β . Indicando que, a mudança no padrão de síntese das citocinas, pela administração de outra citocina (IFN β), interfere na cascata inflamatória que resulta na desmielinização.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSSON, P.B.; GOODKIN, D.E. Glucocorticosteroid therapy for multiple sclerosis: A critical review. **J Neurol Sci.**, 160: 16-25, 1998.

BEVILACQUA, M.P. Endothelial-Leukocyte Adhesion Molecules. **Annu Rev Immunol**, 11:767-804, 1993.

BONGIOANNI P.; MOSTI S.; MOSCATO G.; LOMBARDO F.; MANILDO C.; MEUCCI G. Decreases in T-Cell Tumor Necrosis Factor α binding with Interferon Beta treatment in patients with Multiple Sclerosis. **Arch Neurol**, 56: 71-78, 1999.

BOOSS, J.; DANN, P.R.; WINKLER, S.R.; GRIFFITH, B.P.; KIM, J.H. Mechanisms of Injury to the Central-Nervous-System Following Experimental Cytomegalovirus-Infection. **Am J. Otolaryngol**, 11 (5): 313-317, 1990.

BROSNAN, C.F.; CANNELLA, B.; BATTISTINI, L.; RAINE, C.S. Cytokine localization in multiple-sclerosis lesions: correlation with adhesion molecule expression and reactive nitrogen species. **Neurology**, 45(6): S16-S21, 1995.

BRUSTEIN, M.; KRAAL, G.; MEBIUS, R.E.; WATSON, S.R. Identification of a soluble form of a ligand for the lymphocyte homing receptor. **J. Exp Med**, 176(5): 1415-1419, 1992.

BYRNES, A.A.; MCARTHUR, J.C.; KARP, C.L. Interferon- β Therapy for Multiple Sclerosis Induces Reciprocal Changes In Interleukin 12 and Interleukin 10 Production. **Ann. Neurol**, 51(2): 165-174, 2002.

CHABOT, S.; YONG, V.W. Interferon beta-1b increases interleukin-10 in a model of T cell-microglia interaction: Relevance to MS. **Neurology**, 55(10): 1497-1505, 2000.

CHEN, Y.; INOBE, J.I.; KUCHROO, V.K.; BARON, J.L.; JANEWAY, JR C.; WEINER, H.L. Oral tolerance in myelin basic protein T-cell receptor transgenic mice: Suppression of autoimmune encephalomyelitis and dose-dependent induction of regulatory cells. **Proc Natl. Acad. Sci. USA**, 93: 338-392, 1996.

CHEN, Y.; KUCHROO, V.K.; INOBE, J-I; HAFLER, D.A.; WEINER, H.L. Regulatory T Cell Clones Induced by Oral Tolerance: Suppression of Autoimmune Encephalomyelitis. **Science**, 265:1237-1240, 1994.

CHITNIS, T.; KHOURY, S.J. Role of costimulatory pathways in the pathogenesis of multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. **J. Allergy Clin Immunol**, 112 (5): 837-849, 2003.

COHEN, I.R. T Cell Vaccination for Autoimmune Disease: a Panorama. **Vaccine**, 20: 706-710, 2002.

COMABELLA, M.; BALASHOV, K.; ISSAZADEH, S.; SMITH, D.; WEINER, H.L.; KHOURY, S.J. Elevated Interleukin-12 in Progressive Multiple Sclerosis Correlates with Disease Activity and is Normalized by pulse Cyclophosphamide Therapy. **J. Clin Invest**, 102: 671-678, 1998.

COMI, G.; MOIOLA, L. Glatiramer Acetate. **Neurologia**, 17 (5): 244-58, 2002.

CORREALE, J.; GILMORE, W.; LI, S.; WALSH, J.; BASSANI, M.M.; LUND, B.; et al. Resistance to glucocorticoid-induced apoptosis in PLP peptide-specific T cell clones from patients with progressive MS. **J. Neuroimmunol**, 109 (2): 197-210, 2000.

COSTA, P.M.; YASUDA, C.L.; SCAGLIUSI, S.M.; DIAZ-BARDALES, B.M.; MACIEL, E.; DAMASCENO, B.P.; et. al. Pattern of Cytokines secretion by peripheral blood cells of patients with Multiple sclerosis in Brazil. **Mult Scler**, 6:293-299, 2000.

DORE-DUFFY, P.; NEWMAN, W.; BALABANOV, R.; LISAK, R.P.; MAINOLFI, E.; ROTHLEIN, R.; et. al. Circulating Soluble Adhesion Proteins in Cerebrospinal Fluid and Serum of Patients with Multiple Sclerosis: Correlation with Clinical Activity. **Ann. Neurol**, 37:55-62, 1995.

DRUET, P.; SHEELA, R.; PELLETIER, L. Th1 and Th2 Cells in Autoimmunity. **Chem Immunol**, 63: 158-170, 1996.

DURELLI, L.; VERDUN, E.; BARBERO, P.; BERGUI, M.; VERSINO, E.; GHEZZI, A.; et al. And the Independent Comparison of Interferon (INCOMIN) Trial Study Group. Every-other-day interferon beta-1b versus once-weekly interferon beta-1a for multiple sclerosis: results of a 2-year prospective randomised multicentre study (INCOMIN). **Lancet**, 359: 1453-1460, 2002.

FARIAS, A.S.; DE LA HOZ, C.; CASTRO, F.R.; REIS, J.R.R.; SILVA, J.S.; LANGONE, F. et al. Nitric oxide and TNF α effects in experimental autoimmune encephalomyelitis demyelination. *No prelo*, 2004.

FILIPPINI, G.; MUNNARI, L.; INCORVAIA, B.; EBERS, G.C.; POLMAN, C.; D'AMICO, R.; et al. Interferons in relapsing remitting multiple sclerosis: a systematic review. **Lancet**, 361: 545-552, 2003.

GE, Y.; GROSSMAN, R.I.; UDUPA, J.K.; FULTON, J.; CONSTANTINESCU, C.S.; GONZALES-SCARANO, F.; et al. Glatiramer acetate (Copaxone) treatment in relapsing-remitting MS. Quantitative MR assessment. **Neurology**, 54: 813-817, 2000.

GENÇ, K.; DONA, D.L.; REDER, A.T. Increased CD80+ B Cells in Active Multiple Sclerosis and Reversal by Interferon beta-1b Therapy. **J. Clin Invest**, 99: 2664-2671, 1997.

GEARING, A.J.H.; NEWMAN, W. Circulating Adhesion Molecules in Disease. **Immunol Today**, 14: 506-512, 1993.

GOODKIN, D.S.; FROHMAN, E.M.; GARMANY, G.P.; HALPER, J.; LIKOSKY, W.H.; LUBLIN, F.D.; et al. Disease modifying therapies in Multiple Sclerosis. Report of the Therapeutics and Technology Assessment subcommittee of the American Academy of Neurology and the MS council for clinical practice guidelines. **Neurology**, 169-178, 2002.

GOODKIN, D.E. The North American Study Group on Interferon Beta 1b in secondary progressive Multiple Sclerosis. **Neurology**, 54(12): 6-27, 2000.

HAFLER, D.A.; WEINER, H.L. Multiple sclerosis: A CNS and systemic autoimmune disease. **Immunol Today**, 10(3): 104-107, 1989.

HALLAL, D.E.M.; FARIAS, A.S.; OLIVEIRA, E.C.; DIAZ-BARDALES, B.M.; BRANDAO, C.O.; PROTTI, G.G.; et al. Costimulatory Molecules Expression on Leukocytes from Mice with Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Treated with IFN beta. **J Interferon Cytokine Res**, 23 (6): 293-298,2003.

HALLAL-LONGO, D.E.M.; MIRANDOLA, S.R.; OLIVEIRA, E.C.; FARIAS, A.S.; PEREIRA, F.G.; BRANDÃO, C.O.; DAMASCENO, B.P.; et al. Diminished myelin-specific T cell activation associated with increase in CTLA4 and Fas molecules in Multiple sclerosis patients treated with Interferon beta. *No prelo*, 2004.

HARTUNG, H. P.; REINERS, K.; ARCHELOS, J.J.; MICHELS, M.; SEELDRAYERS, P.; HEIDENREICH, F.; et al. Circulating Adhesion Molecules and Tumor Necrosis Factor in Multiple Sclerosis: Correlation with Magnetic Resonance Imaging. **Ann. Neurol**, 38:186-193, 1995.

HERRERA, B.M.; EBERS, G.C. Progress in deciphering the genetics of multiple sclerosis. **Curr Opin Neurol**, 16: 253-258, 2003.

HUANG, Y.M.; HUSSIEN, Y.; JIN, Y.P.; SÖDERSTROM, M.; LINK, H. Multiple Sclerosis: Deficient in vitro Responses of Blood Mononuclear Cells to IFN β . **Acta Neurol Scand**, 104: 249-256, 2001.

HUANG, Y.M.; STOYANOVA, N.; HUSSIEN, Y.; JIN, Y.P.; TELESHOVA, N.; XIAO, B.G.; et al. Altered Phenotype and Function of Blood Dendritic Cells in Multiple Sclerosis are Modulated by IFN β and IL10. **Clin Exp Immunol**, 124: 306-314, 2001.

HUSSIEN, Y.; SANNA, A.; SODERSTROM, M.; LINK, H.; HUANG, Y-M. Glatiramer Acetate and IFN β act on Dendritic Cells in Multiple Sclerosis. **J. Neuroimmunol**, 121: 102-110, 2001.

JACOBS, L.D.; COOKFAIR, D.L.; RUDICK, R.A.; HERNDON, R.M.; RICHERT, J.R.; SALAZAR, A.M.; et. al. Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. **Ann Neurol**, 39 (3): 285-294, 1996.

JOHNSON, K.P.; BROOKS, B.R.; COHEN, J.A.; FORD, C.C.; GOLDSTEIN, J.; LISAK, R.P.; et al. Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind placebo-controlled trial. **Neurology**, 45: 1268-1276, 1995.

KARP, C.L.; BIRON, C.A.; IRANI, D.N. Interferon in multiple sclerosis: is IL-12 suppression the key? **Immunol Today**, .21:24-28, 2000.

KHOURY, S.; AKALIN, E.; CHANDRAKER, A.; TURKA, L.A.; LINSLEY, P.S.; SAYEGH, M.H.; et al. CD28-B7 Costimulatory Blockade by CTLA4 ig Prevents Actively Induced Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Inhibits Th1 but Spares Th2 Cytokines in the Central Nervous System. **J. Immunol**, 155: 4521-4524, 1995.

KHOURY, S.J.; HANCOCK, W.W.; WEINER, H.L. Oral tolerance to myelin basic protein and natural recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis are associated with downregulation of inflammatory cytokines and differential upregulation of transforming growth factor beta, interleukin 4, and prostaglandin E expression in the brain. **J. Exp. Med**, 176: 1355-1364, 1992.

KOMATSU, N.; SHIGEKI, S.; MAEDA, Y.; ITOH, K. Measurement of interferon γ by high-throughput fluorometric microvolume assay technology system. **J. Immunol Meth**, 263(1-2): 169-176, 2002.

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

KURTZKE, J.F. Rating neurological impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). **Neurology**, 33: 1444-1452, 1983.

LENSCHOW, D.J.; WALUNAS, T.L.; BLUESTONE, J.A. CD28/B7 System of T Cell Costimulation. **Annu. Rev. Immunol**, 14:233-58, 1996.

LENARDO, M.J.; CHAN, K.M, HORNUNG, F., MCFARLANE, H.; SIEGEL, R.; WANG, J.; ZHENG, L. Mature T Lymphocyte Apoptosis Immune Regulation in a Dynamic and Unpredictable Antigenic Environment. **Ann Rev Immunol**, 17: 221-253, 1999.

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

LIDER, O.; SANTOS, L.M.B.; LEE, C.S.Y.; HIGGINS, P.J.; WEINER, H.L. Suppression of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by the Oral Adminsitration of Myelin Basic Protein. II Suppression of the Disease and in vitro Immune Responses Mediated by Antigen-Specific CD8+ T Lymphocytes. **J. Immunol**, 141: 748-753, 1989.

LIU, Z.; PELFREY, C.M.; COTLEUR, A.; LEE,J-C.; RUDICK, R.A. Immunomodulatory Effects of Interferon beta-1a in Multiple Sclerosis. **J. Neuroimmunol**, 112: 153-162, 2001.

LOSY, J.; MICHALOWSKA-WENDER, G. In vivo Effect of Interferon- β 1a on Interleukin-12 and TGF β Cytokines in Patients with Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. **Acta Neurol Scand**, 106: 44-46, 2002.

MARTINO, G.; ADORINI, L.; RIECKMANN, P.; HILLERT, J.; KALLMANN, B.; COMI, G.; et al. Inflammation in multiple sclerosis: the good, the bad, and the complex. **Lancet Neurol**, 1(8): 499-509, 2002.

MILLER, A.; AL-SABBAGH, A.; SANTOS, L.M; DAS, M.P.; WEINER, H.L. Epitopes of myelin basic protein that trigger TGF β release after oral tolerization are distinct from encephalitogenic epitopes and mediate epitope-driven bystander suppression . **J. Immunol**, 151: 7307-7315, 1993.

MOKHTARIAN, F.; SHI, Y.; SHIRAZIAN, D.; MORGANTE, L.; MILLER, A.; GROB, D. Defective Production of Anti-Inflammatory Cytokine TGF β by T Cell Lines of Patients with Active Multiple Sclerosis. **J. Immunol**, 152:6003-6011, 1994.

MOSMANN, T.R.; SAD, S. The expanding universe of T- cell subsets: Th1, Th2 and more. **Immunol Today**, 17 (3): 138-146, 1996.

MOSMANN, T.R.; COFFMAN, R.L. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Adv Immunol*, 46: 111-147, 1989.

MOSMANN, T.R. Two types of murine helper T cell clone. **J. Immunol**, 136:2348-2357, 1986.

MUELLER, D.L.; JENKINS, M.K.; SCHWARTZ, R.H. Clonal Expansion Versus Functional Clonal Inactivation: A Costimulatory Signalling Pathway Determines the Outcome of T Cell Antigen Receptor Occupancy. **Annu. Rev. Immunol**, 7: 445-480, 1989.

NAVIKAS, V.; LINK, H. Cytokine and the pathogenesis of multiple sclerosis. **J Neurosci Res**, 45(4): 322-333, 1996.

NEUHAUS, O.; ARCHELOS, J.; HARTUNG, H. Immunomodulation in multiple sclerosis: from immunosuppression to neuroprotection. **Trends Pharmacol Sci**, 24(3): 131-138, 2003.

NIKCEVICH, K.M.; GORDON, K.B.; TAN, L.; HURST, S.D.; KROEPFL, J.F.; GARDINIER, M.; et. al. IFN γ Activated primary murine astrocytes express B7 costimulatory molecules and prime naive antigen-specific T cells. **J. Immunol**, 158: 614-521, 1997.

NIEPEL, G.G.; CONSTANTINESCU, C.S. Aetiology and pathogenesis of multiple sclerosis. **Roy Pharm Soc Great Britain**, 10: 113-18, 2003.

OTA, K.; MATSUI, M.; MILFORD, E.L.; MACKIN, G.A.; WINER, H.L.; HAFLER, D.A. T cell recognition of an immunodominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis. **Nature**, 346(6280): 183-187, 1990.

OZMEN, L.; AGUET, M.; TRINCHIERI, G.; GAROTTA, G. The in vivo antiviral activity of Interleukin 12 is mediated by Gamma Interferon. **J. Virol**, 69: 8147-8150, 1995.

PANITCH, H.S.; HIRSCH, R.L.; SCHINDLER, J.; JOHNSON, K.P. Treatment of multiple sclerosis with gamma interferon: Exacerbations associated with activation of the immune system. **Neurology**, 37: 1097-1102, 1987.

PATY, D.W.; LI, D.K. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. II MRI analysis of results of a multicenter, randomized, double-blind and placebo controlled trial. **Neurology**, 43: 662-667, 1993.

PETEREIT, H.F.; BAMBORSCHKE, S.; ESSE, A.D.; HEISS, W.D. Interferon Gamma Producing Blood Lymphocytes are Decreased by Interferon Beta Therapy in Patients with Multiple Sclerosis. . **Mult Scler**, 3:180-3, 1997.

POSER, C.M.; PATY, D.W.; SCHEINBERG, L.; MCDONALD, W.I.; DAVIS, F.A.; EBERS, G.C.; et. al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for reserch protocols. **Ann. Neurol**, 13: 227-231, 1983.

PRISMS-4 Long-term efficacy of interferon [beta] 1a in relapsing MS. **Neurology**, 56(12): 1628-1636, 2001.

PRISM (Prevention of relapses, disability by interferon beta 1-a subcutaneously in multiple sclerosis study group). Randomised double-blind placebo-controlled study of interferon beta 1-a in relapsing-remitting multiple sclerosis. **Lancet**, 352: 1498-1504, 1998.

READ, S., MALMSTROM, V., POWRIE, F., Cytotoxic T Lymphocyte Associated Antigen 4 Plays an Essential Role in the Function of CD25CD4 Regulatory Cells that Control Intestinal Inflammation. **J. Exp. Med.** 192: 295-302, 2000.

REDELICH, E.N.; HOEPPPRINCH, P.D.; COLBY, C.B.; GROSSBERG, S.E. Antibodies that neutralize human β interferon biologic activity recognize a linear epitope: Analysis by synthetic peptide mapping. **Proc Nath Acad Sci USA**, 88: 4040-4044, 1991.

ROMAGNANI, S.; MANETTI, R.; ANNUNZIATO, F.; MAGGI, E. Role of IL12 in the development of human Th1 type cells. **Res Immunol**, 146 (7-8): 457-459, 1995.

RUULS, S.R.; SEDGEWICK, J.D. Cytokine-Directed Therapies In Multiple Sclerosis and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **Immunol Cell Biol**, 76: 65-73, 1998.

SANTOS, L.M.B.; AL-SABBAGH, A.; LONDONO, A.; WEINER, H.L. Oral tolerance to myelin basic protein induces regulatory TGF β secreting T cells in Peyer's patches of SJL mice. **Cell Immunol**, 157:439-447, 1994.

SCHEIPERS, P. E REISER, H. Fas-Independent Death of Activated CD4+ T Lymphocytes Induced by CTLA4 Crosslinking. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 95: 10083-88, 1998.

SCHMIED, M.; DUDA, P.W.; KRIEGER, J.I.; TROLLMO, C.; HAFLER, D.A. In vitro evidence that subcutaneous administration of glatiramer acetate induces hyporesponsive T cells in patients with multiple sclerosis. **Clin Immunol**, 106: 163-174, 2003.

SCHWARTZ, M.; COHEN, I.R. Autoimmunity can benefit self-maintenance. **Immunol Today**, 21(6): 265-268, 2000.

SEDGWICK, J.C.; RIMINTON, D.S.; CYSTER, J. C.; KORNER, H. Tumor necrosis factor: a master-regulator of leukocyte movement. **Immunol Today**, 21: 110-112, 2000.

SELMAJ, K.; WALCZAK, A.; MYCKO, M.; BERKOWICZ, T.; KHNO, T.; et al. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis with a TNF α binding protein (TNFb) correlates with down-regulation of VCAM-1/VLA-4. **Eur J. Immunol**, 28(6): 2035-2044, 1998.

SHARIEF, M.K.; NOORI, M.A.; CIARDI, M. Increased Levels of Circulating ICAM-1 in Serum and Cerebrospinal Fluid of Patients with Active Multiple Sclerosis. Correlation with TNF Alpha and Blood Brain Barrier Damage. **J. Neuroimmunol**, 43: 15-21, 1993.

SPORN, M.B.; ROBERTS, A.B. Transforming growth factor- β recent progress and news challenges. **J. Cell Biol**, 119:1017-1021, 1992.

SPRINGER, T.A. Traffic Signals for Lymphocyte Recirculation and Leukocyte Emigration: The Multiple Step Paradigm. **Cell**, 76:301-314, 1994.

STEINKE, J.W.; BORISH, L.; ROSENWASSER, L.J. Genetics of hypersensitivity. **J. Allerg Clin Immunol**, 11(2): S460-S475, 2003.

STEINMAN, L. Multiple sclerosis: A coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. **Cell**, 85(3): 299-302, 1996.

TAKAHASHI, T., TAGAMI, T., YAMAZAKI, S., UED, T., SHIMIZU, J., SAKAGUSHI, N., MAK, T.W., SAKAGUSCHI, S. Immunologic Self Tolerance Maintained by CD25CD4 Regulatory T Cells Constitutively Expressing Cytotoxic T Lymphocyte Associated Antigen 4. **J. Exp. Med.** 192: 303-310, 2000.

TSUKADA, N.; MIYAAGI, K.; MATSUDA, M. Increased Levels of Circulating Intercellular Adhesion Molecule-1 in Multiple Sclerosis and Human T-Lymphotropic Virus Type 1 Associated Myelopathy. **Ann Neurol**, 33:591-596, 1993.

VANDENBARK, A.A.; MORGAN, E.; BARTHOLOMEW, R.; BOURDETTE, D.; WHITHAM, R.; CARLO, D.; et al. TCR Peptide Therapy in Human Autoimmune Diseases. **Neurochem. Res**, 26(6): 713-30, 2001.

VANDENBARK, A.A.; CHOU, Y.K.; WHITHAM, R.; MASS, M.; BUENAFE, A.; LIEFELD, D.; et al. Treatment of Multiple Sclerosis with T Cell Receptor Peptides: Results of a Double-Blind Pilot Trial. **Nat. Med**, 2: 1109-1115, 1996.

VANDENBARK, A.A.; CHOU, Y.K.; BOURDETTE, D.; WHITHAM, R.; HASHIM, G.; OFFNER, H. T Cell Receptor Peptide Therapy for Autoimmune Disease. **J. Autoimm**, 5 (Supl A): 83, 1992.

WAKSMAN, B. Mechanisms in multiple sclerosis. **Nature**, 318: 104-105, 1985.

WASHINGTON, R.; BURTON, J.; TODD, R.F. Expression of Immunologically Relevant Endothelial Cell Activation Antigens on Isolated Central Nervous System Microvessels from Patients with Multiple Sclerosis. **Ann. Neurol**, 35: 89-97, 1994.

WEINER, H.L.; SELKOE, D.J. Inflammation and Therapeutic Vaccination in CNS Diseases. **Nature**, 420: 879-884, 2002.

WEINER, H.L.; FRIEDMAN, A.; MILLER, A.; KHOURY, S.J.; AL-SABBAGH, A.; SANTOS, L.M.B.; et al. Oral Tolerance: Immunologic Mechanisms and Treatment of Animal and Human Organ-Specific Autoimmune Diseases by Oral Administration of Autoantigens. **Ann. Rev. Immunol**, 12:809-837, 1994.

WEINER, H.L.; MACKIN, G.A.; MATSUI, M.; ORAV, E.J.; KHOURY, S.J.; DAWSON, D.M.; HAFLER, D.A. Double-blind pilot trial of oral tolerization with myelin antigens in multiple sclerosis. **Science**, 259: 1321-1324, 1993.

WILLER, C.J.; EBERS, G.C. Susceptibility to multiple sclerosis: interplay between genes and environment. **Curr Opin Neurol**, 13:241-247, 2000.

WUCHERPFENING, K.W.; STROMINGER, J.L. Molecular Mimicry In T Cell-Mediated Autoimmunity: Viral peptides active human T cells clones specific for Myelin basic protein. **Cell**, 80: 695-705, 1995.

YASUDA, C.L.; AL-SABBAGH, A.; OLIVEIRA, E.C.; DIAZ-BARDALES, B.M.; GARCIA, C.A.A.C.; SANTOS, L.M.B. Interferon beta modulates experimental autoimmune encephalomyelitis by altering the pattern of cytokine secretion. **Immunol Invest**, 28:115-126, 1999.

ZHANG, J.Z.; RIVERA, V.M.; TEJADA-SIMON, M.V.; YANG, D.; HONG, J.; LI, S.; HAYKAL, H.; et al. T Cell Vaccination in Multiple Sclerosis: Results of a Preliminary study. **J. Neurol**, 249: 212-218, 2002.

WAKSMAN, B. Mechanisms in Multiple Sclerosis. **Nature**, 318: 104-105, 1985.

ANEXOS

PACIENTES PORTADORES DE ESCLEROSE MÚLTIPLA TRATADOS COM IFN β

#	INDIVÍDUOS	CLASSIFICAÇÃO DA DOENÇA	INÍCIO DO TRATAMENTO	IDADE	SEXO
1	AB	Surto Remissão	2002	36	M
2	ALDA	Surto Remissão	2001	30	M
3	AMAP	Surto Remissão	2001	28	F
4	AMIP	Surto Remissão	2001	46	F
5	APRT	Surto Remissão	1998	31	F
6	CAL	Surto Remissão	1997	51	M
7	CAS	Surto Remissão	1999	46	M
8	CF	Surto Remissão	1998	56	F
9	CRCGJ	Surto Remissão	2000	30	M
10	EPM	Surto Remissão	1997	30	F
11	ESA	Surto Remissão	1998	32	F
12	ESCP	Surto Remissão	2000	20	F
13	FDGP	Surto Remissão	1998	44	F
14	FMP	Surto Remissão	2001	25	F
15	FTV	Surto Remissão	2000	30	M
16	GGV	Surto Remissão	2001	25	F
17	ICP	Surto Remissão	1999	32	F
18	JBF	Surto Remissão	2002	40	M
19	JLA	Surto Remissão	1997	42	M
20	JSL	Surto Remissão	1998	45	F
21	JVS	Surto Remissão	1999	42	M
22	LAN	Progressiva Secundária	1999	26	F
23	LDM	Surto Remissão		24	F
24	LFA	Surto Remissão	2000	35	F
25	LFR	Surto Remissão	1997	47	F
26	LGP	Surto Remissão	2000	37	F
27	LGPM	Surto Remissão	2000	46	M
28	LVS	Surto Remissão	2000	16	F
29	LSM	Surto Remissão	1999	35	F
30	MAMR	Surto Remissão	2000	40	F
31	MFOL	Surto Remissão	2002	46	F
32	MGP	Surto Remissão	2002	56	F
33	MGSM	Surto Remissão	1997	53	F
34	MISP	Surto Remissão	1999	48	F

#	INDIVÍDUOS	CLASSIFICAÇÃO DA DOENÇA	INÍCIO DO TRATAMENTO	IDADE	SEXO
35	MMBC	Surto Remissão	1997	45	F
36	MMGV	Surto Remissão	2002	47	F
37	MRD	Surto Remissão	2002	40	F
38	MRM	Surto Remissão	1997	32	M
39	PCMS	Surto Remissão	1998	35	M
40	RAM	Surto Remissão	1996	28	F
41	RB	Surto Remissão	2002	39	F
42	RBM	Surto Remissão	1997	43	F
43	RGJ	Surto Remissão	2001	41	M
44	RVF	Surto Remissão	2001	36	F
45	SATR	Surto Remissão	2001	43	F
46	SBL	Surto Remissão	1998	28	F
47	SMGI	Surto Remissão	1998	49	F
48	VACS	Surto Remissão	2002	37	F
49	VLR	Surto Remissão	1999	56	F
50	VMG	Surto Remissão	1997	41	F

**PACIENTES PORTADORES DE ESCLEROSE MÚLTIPLA NÃO TRATADOS
COM IFN β .**

#	INDIVÍDUOS	CLASSIFICAÇÃO DA DOENÇA	IDADE	SEXO
1	AC	Progressiva Primária	42	M
2	ACA	Surto Remissão	20	F
3	ACP	Progressiva Secundária	58	F
4	ADS	Surto Remissão	29	F
5	ASM	Progressiva Primária	48	M
6	CRB	Surto Remissão	36	F
7	DMR	Progressiva Primária	48	F
8	DSM	Progressiva Secundária	38	F
9	ECSH	Surto Remissão	24	F
10	EDS	Progressiva Primária	44	M
11	GNO	Progressiva Primária	65	F
12	IRM	Surto Remissão	21	F
13	LASA	Surto Remissão	44	F
14	LGB	Progressiva Primária	43	F
15	LMD	Progressiva Secundária	54	F
16	MGFD	Surto Remissão	51	F
17	MGS	Surto Remissão	17	F
18	MMPS	Progressiva Secundária	29	F
19	MRCM	Surto Remissão	44	F
20	NLB	Progressiva Primária	54	F
21	NNAO	Surto Remissão	43	F
22	OJF	Progressiva Secundária	44	M
23	OSC	Progressiva Secundária	63	F
24	RBS	Surto Remissão	29	F
25	RBS	Surto Remissão	18	F
26	RC	Surto Remissão	13	M
27	SA	Progressiva Secundária	43	F
28	SSJ	Progressiva Secundária	43	F
29	TAS	Progressiva Primária	23	F
30	TRDL	Progressiva Secundária	48	F

INDIVÍDUOS NORMAIS

#	INDIVÍDUOS	IDADE	SEXO
1	AGS	39	F
2	ASF	26	M
3	CES	42	M
4	CESPF	33	M
5	COB	22	F
6	COS	35	F
7	DSS	22	M
8	DEMH	28	F
9	DFR	33	F
10	DMS	43	F
11	DMCJ	28	F
12	ECSP	31	F
13	EG	28	F
14	GAG	26	M
15	JLS	33	F
16	JP	45	M
17	JRDE	30	M
18	JRE	29	F
19	KKF	27	M
20	KLJ	24	M
21	LSG	23	M
22	LCFD	31	M
23	LGS	25	M
24	LMBS	58	F
25	LMS	35	F
26	LU	33	F
27	LW	21	M
28	MC	27	F
29	MCAZ	38	F
30	MCC	31	M
31	MJ	45	F
32	MJS	23	F
33	MM	30	F
34	MR	23	F
35	RC	30	F
36	RLB	30	F
37	SALM	29	F
38	SEM	36	M
39	WB	41	F