



Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

Instituto Biomédico



Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular

PAPEL DA SEROTONINA EM MODULAR O PERFIL FENOTÍPICO E FUNCIONAL DAS CÉLULAS T DE PACIENTES COM ESCLEROSE MÚLTIPLA

Priscila Mendonça do Sacramento

Orientação: Prof^a Dr^a Cleonice Alves de Melo Bento

Rio de Janeiro

2016

Priscila Mendonça do Sacramento

**PAPEL DA SEROTONINA EM MODULAR O PERFIL FENOTÍPICO E
FUNCIONAL DAS CÉLULAS T DE PACIENTES COM ESCLEROSE
MÚLTIPLA**

Defesa de dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular.

Orientação: Prof^a Dr^a Cleonice Alves de Melo Bento

Rio de Janeiro

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Sacramento, Priscila Mendonça do

Papel da Serotonina em modular o perfil fenotípico e funcional das células T de pacientes com Esclerose Múltipla / Priscila Mendonça do Sacramento -- Rio de Janeiro, 2016.

XVII, 83p.

Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular) – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO

1. Serotonina 2. Esclerose Múltipla 3. Células T

I. Título

Priscila Mendonça do Sacramento

**PAPEL DA SEROTONINA EM MODULAR O PERFIL FENOTÍPICO E
FUNCIONAL DAS CÉLULAS T DE PACIENTES COM ESCLEROSE
MÚLTIPLA**

Defesa de dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular.

Banca examinadora:

Dr^a. Claudia Cristina Vasconcelos (Doutora em Neurologia) – HUGG/UNIRIO

Dr^a. Kênia Balbi El-Jaick [Doutora em Ciências Biológicas (Genética)] – UNIRIO

Dr^a Joana da Silva Machado (Doutora em Microbiologia) – UNIRIO

À minha família, em especial à minha avó Tuninha, aos meus pais Antonio e Rita, e irmãs Sheila e Talita, com amor, admiração e eterna gratidão por toda compreensão, confiança, carinho, presença, mesmo distante, e apoio ao longo do período de elaboração deste trabalho.

À minha querida orientadora Cléo e toda equipe LILiT, por todo apoio, carinho paciência e confiança. Minha eterna gratidão!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade a mim conferida, pela força e por nunca me abandonar.

A meus avós queridos, em especial vó Tuninha, pelo esforço, apoio, dedicação, confiança, amor, pelas orações e por serem avós maravilhosos.

A meu pai, Antonio, que hoje não se faz presente fisicamente, mas sim em cada ação minha, por ter sido um pai maravilhoso e pelo apoio, educação, amor, amizade, carinho e pela oportunidade de estar aqui hoje.

A minha mãe, Rita, por ter me educado, pelo apoio, amor, carinho, compreensão e pelas orações.

A minhas irmãs queridas, Sheila e Talita, pelo companheirismo, apoio, amizade e amor.

A meus tios, em especial Toinho, Claudia, Joãzinho e Consuelo, por todo apoio, carinho, companheirismo, atenção e amor.

A minha madrinha Zezé por todo amor, apoio, dedicação, amizade e pelas orações.

Ao meu namorado David e a minha sogra Davies, pela compreensão, companheirismo, amor e amizade.

A querida mãe científica Cléo, um exemplo de orientadora e de pessoa. Agradeço pelo conhecimento compartilhado, apoio, dedicação, carinho, paciência e amizade.

A minhas amigas Clarice e Aleida, presentes de Deus e do LILLIT, por todo companheirismo, carinho, amizade e pelas risadas compartilhadas.

A todos do laboratório, Taíssa, Thaís, Joana, Priscila, Isabelle, Zé Roberto, Fábio, Lana, Tati e Newton, pelo companheirismo, apoio, e por tornarem o LILLIT um lugar especial.

Ao querido professor, Edwin, pela oportunidade e experiência de ser monitora e pela orientação e conhecimento compartilhado.

A meus presentes da UNIRIO, Najara, Isabela e Carlos, por todo apoio, companheirismo, amizade. Obrigada por me ajudarem a superar vários obstáculos e por tornarem meus dias mais felizes.

A todos meus amigos, em especial à Maisa, pela amizade, companheirismo, apoio, compreensão e pelas risadas.

A um diretor muito especial, Bento, e a família Arco-Íris, pela oportunidade de ter uma boa educação. O apoio e dedicação me fizeram estar aqui hoje.

A família São Luís, professores e funcionários, pela educação de qualidade.

Ao PPGBMC pela oportunidade de conhecer e aprender diversos assuntos de diversas áreas. À Rose, por toda paciência e dedicação para comigo.

Aos pacientes por terem cedido seu tempo e seu sangue para que esse e outros estudos pudessem ser realizados.

As agências de fomento UNIRIO, CAPES, FAPERJ e CNPQ pelo suporte financeiro que possibilitou a realização deste projeto.

Agradeço a todos que me ajudaram a concluir essa etapa e que torceram pela minha vitória.

“Um passo à frente e você já não está no mesmo lugar.”

Chico Science

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE QUADROS	xiv
LISTA DE TABELAS	xv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 – Considerações Gerais	1
1.2 – Sistema Imune	2
1.2.1 – Ativação e diferenciação de linfócitos T efetores: papel das células dendríticas	3
1.2.2 – Regulação da resposta imune: os linfócitos T reguladores	9
1.3 – Esclerose Múltipla	12
1.3.1 – A doença	12
1.3.2 – Imunopatologia	15
1.3.3 – Tratamento	18
1.4 – Serotonina	21
1.4.1 – Serotonina: papel imunomodulador	23
2. OBJETIVOS	26
2.1 – Geral	26
2.2 – Específicos	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 – Pacientes	27
3.2 – Coleta e purificação de células	27
3.3 – Cultura de células mononucleares do sangue periférico e estímulos	28
3.4 – Ensaio de proliferação celular	29
3.5 – Determinação de citocinas	29
3.6 – Análise da frequência de células T CD4+ por citometria de fluxo	30
3.7 – Análise estatística	30
4. RESULTADOS	32

4.1 – Impacto da 5-HT na resposta proliferativa das células T de pacientes com EM-RR	32
4.2 – Efeito da 5-HT na produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatória produzidas pelas células de pacientes com EM-RR.....	33
4.3 – Efeito da 5-HT na produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatória produzidas pelas células TCD4 ⁺ e TCD8 ⁺ purificadas de pacientes com EM-RR	36
4.4 – Papel da 5-HT em modular a frequência de diferentes subtipos de células T CD4 ⁺ produtoras de IL-10 de pacientes com EM-RR	37
4.5 – Capacidade da 5-HT em modular a frequência de subtipos de células TCD4 ⁺	40
5. DISCUSSÃO	43
6. CONCLUSÃO.....	52
REFERÊNCIAS	53
ANEXO – Parecer Consubstanciado do CEP	78
APÊNDICE – Termo de consentimento livre e esclarecido.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT – serotonina

AMPC – adenosina-3'-5'-monofosfato cíclico

APC – célula apresentadora de antígeno

AVD – Atividade de Vida Diária

bcl-2 – fator anti-apoptótico *B-cell lymphoma 2*

CD – grupo de diferenciação

CMSP – células mononucleares do sangue periférico

CTLA-4 – antígeno associado ao linfócito T citotóxico 4

DC – célula dendrítica

EAE – encefalomielite autoimune experimental

EDSS – escala expandida do estado de incapacidade

ELISA – ensaio imunoenzimático (*Enzyme linked immunosorbent assay*)

EM – esclerose múltipla

EM-RR – esclerose múltipla remitente recorrente

FoxP3 – fator de transcrição forkhead Box P3

FS – sistema funcional

ICOS – proteína coestimulatória induzível

ICOS-L – ligante do ICOS

IDO – indoleamina-2,3-dioxigenase

IFN – interferon

Ig – imunoglobulina

IL – interleucina

LAG-3 – molécula de superfície homóloga a CD4 (*Lymphocyte-activation gene 3*)

MAPK – via de sinalização (*Mitogen-activated protein kinase*)

MHC - complexo principal de histocompatibilidade (*Major histocompatibility complex*)

nTreg – célula T reguladora natural

PHA – fitohemaglutinina

PK – proteína quinase

RNA – ácido ribonucléico

SERT – transportador específico de 5-HT (*Serotonin transporter*)

SSRI – inibidor seletivo da recaptação de serotonina

Tc-1 – célula T citotóxica do tipo 1

TCR – receptor da célula T

TGF- β – fator β de crescimento tumoral

Th1 – célula T helper ou auxiliadora do tipo 1

Th17 - célula T helper ou auxiliadora do tipo 17

Th2 – célula T helper ou auxiliadora do tipo 2

Th22 – célula T help ou auxiliadora do tipo 22

TMD – terapias modificadoras da doença

TNF- α – fator de necrose tumoral

Tr-1 – linfócitos reguladores do tipo 1

Treg – célula T reguladora

VLA-4 – integrina $\alpha 4\beta 1$

LISTA DE FIGURAS

Fig.1 – Eventos envolvidos na diferenciação das principais células T CD4 ⁺ efectoras.....	6
Fig.2 – Eventos envolvidos na diferenciação das principais células T CD8 ⁺ efectoras.....	8
Fig.3 – As células T reguladoras e a homeostase imune.....	11
Fig.4 – Estrutura química da serotonina	21
Fig.5 – Via de síntese da serotonina.....	22
Fig.6 – Efeito <i>in vitro</i> da serotonina (5-HT) sobre a proliferação das células T de pacientes com EM-RR.....	33
Fig.7 – Efeito <i>in vitro</i> da serotonina (5-HT) na produção de IFN- γ pelas células T de pacientes com EM-RR.....	34
Fig.8 – Impacto da 5-HT na produção de citocinas pró-inflamatórias relacionadas e específicas ao perfil Th17 nos pacientes com EM-RR..	35
Fig.9 – Impacto da serotonina (5-HT) na produção de IL-10 pelas células T de pacientes com EM-RR.....	36
Fig.10 – Capacidade da serotonina (5-HT) em modular a produção de citocinas pelas células T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ de pacientes com EM-RR.....	37
Fig.11 – Impacto da serotonina (5-HT) em modular a frequência de células T CD4 ⁺ produtoras de IL-10.....	38
Fig.12 – Impacto da serotonina (5-HT) em modular a frequência de células Tregs clássicas e Tr-1	39
Fig.13 – Impacto da serotonina (5-HT) em modular a coexpressão de marcadores de funcionalidade nas células T CD4 ⁺ FoxP3 ⁺	40
Fig.14 – Capacidade da serotonina (5-HT) em modular a frequência de fenótipos de células T	41

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Os sistemas funcionais avaliados no âmbito da Escala Expandida do Estado de Incapacidade (EDSS – do inglês <i>Expanded Disability Status Scale</i>)	14
Quadro 2. Escala Expandida do Estado de Incapacidade (EDSS)	14
Quadro 3. Terapias modificadoras da doença e seus mecanismos de ação	19

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características da população estudada	32
---	----

RESUMO

A esclerose múltipla (EM) é uma doença autoimune desmielinizante do sistema nervoso central, sendo o curso remitente recorrente a forma mais prevalente da doença. Apesar de a EM ser considerada uma doença autoimune de mediação celular, tanto o seu desenvolvimento quanto gravidade são influenciados por diferentes fatores de risco, tal como o estresse. Em adição às incapacidades físicas, transtornos de humor, como a depressão, são comuns nos pacientes com EM. Nesse sentido, classicamente, os níveis de serotonina, também conhecida como 5-hidrotriptanamina (5-HT), são reduzidos durante a depressão. Como a 5-HT possui diferentes efeitos imunomoduladores, o objetivo do presente estudo foi investigar a capacidade da serotonina em modular o status funcional das células T de pacientes com EM na fase de remissão clínica. Para esse estudo, amostras de sangue foram colhidas e células mononucleares periféricas (CMSP) foram purificadas de pacientes (n=27) e de indivíduos saudáveis (n=29). Para ativar policlonalmente as células T, as culturas de CMSP foram mantidas por 3 dias na presença de PHA. Em alguns experimentos, células T CD4⁺ e T CD8⁺ foram purificadas dos pacientes com EM e estimuladas por 3 dias na presença de anticorpos anti-CD3/anti-CD28. Finalmente, para os experimentos de citometria de fluxo, as culturas de CMSP foram ativadas por 4h na presença de PMA e ionomicina na presença de Brefeldina A. O efeito da serotonina no perfil imune foi avaliado adicionando 200 ng/mL de 5-HT no início do tempo de cultura. Em nosso estudo, nós observamos que tanto a resposta proliferativa, determinada pela captura de [3H] timidina, quanto a liberação de IFN- γ , TNF- α e IL-6, quantificadas por ELISA, foram reduzidas pela 5-HT adicionadas às culturas de CMSP ativadas de ambos os grupos experimentais. Adicionalmente, a 5-HT reduziu a produção de IL-17 e IL-21 nas culturas de CMSP apenas dos pacientes. Por outro lado, a 5-HT elevou a produção de IL-10 em todas as culturas de células. Nos pacientes com EM, os efeitos da 5-HT em modular a produção de citocinas foi particularmente mais evidentes no compartimento das células T CD4⁺. Uma análise mais detalhada demonstrou que a 5-HT foi capaz de reduzir a frequência de células Th1 e Th17, enquanto favoreceu a expansão de células T reguladoras CD39⁺ produtoras de IL-10. Logo, nossos resultados demonstraram um efeito anti-inflamatório dominante da 5-HT sobre as células T dos pacientes com EM. Levando em consideração que a depressão é caracterizada por uma redução de 5-HT, nossos resultados explicam, ao menos em parte, por que transtornos de humor podem ter um impacto negativo no curso clínico da EM.

Palavras-chave: serotonina, esclerose múltipla, células T, citocinas, Th1, Th17, Treg.

ABSTRACT

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune demyelinating disease of the central nervous system, and the relapsing remitting course is the most prevalent form of the disease. Although MS is considered a cellular-mediated autoimmune disease, its development, as well as severity, are affected by various risk factors, such as stress. In addition to the physical disabilities, mood disorders, such as depression, are common in patients with MS. It is well known that serotonin levels, also known as 5-hydroxytryptamine (5-HT), are reduced during the depression. As the 5-HT has different immunomodulatory effects, the aim of this project was to investigate the ability of serotonin to modulate the functional status of T cells of MS patients in clinical remission. For this study, blood samples were collected and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were purified from patients (n = 27) and healthy individuals (n = 29). To activate T cells, PBMC cultures were maintained for 3 days in presence of PHA. In some experiments, CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells were purified from MS patients and stimulated for 3 days in the presence of anti-CD3/anti-CD28 antibodies. Finally, for the flow cytometry experiments, cultures of PBMC were activated for 4 hours in the presence of PMA plus ionomycin. The effect of serotonin on the immune profile was evaluated by adding 200 ng/ml of 5-HT at the beginning of time of culturing. In our study, we observed that both proliferative response, determined by the [3H] thymidine up-take, as well as the release of IFN- γ , TNF- α and IL-6, quantified by ELISA, were reduced by 5-HT added to activated PBMC cultures obtained from both experimental groups. Additionally, the 5-HT reduced IL-17 and IL-21 only in PBMC cultures from patients. Furthermore, 5-HT increased IL-10 production in all cell cultures. In MS patients, the effects of 5-HT in modulating cytokine production was more evident in the compartment of CD4⁺ T cells. A more detailed analysis has shown that 5-HT was able to reduce the frequency of Th1 and Th17 cells, while favoring the expansion of IL-10-producing regulatory CD39⁺ T cells. In conclusion, our results demonstrated a dominant anti-inflammatory effect of 5-HT on T cells from MS patients. Taking into consideration that the depression is characterized by a reduction of 5-HT levels, our results could explain, at least in part, because mood disorders could have a negative impact on the MS clinical course.

Keywords: serotonin, multiple sclerosis, T cells, cytokines, Th1, Th17, Treg.

1. INTRODUÇÃO

1.1 – Considerações Gerais

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença autoimune inflamatória crônica do Sistema Nervoso Central (SNC), com curso clínico heterogêneo, caracterizada pela inflamação e desmielinização no parênquima cerebral, degeneração axonal e gliose (DECK *et al.*, 2013). É uma doença causada pela complexa interação entre fatores genéticos e ambientais (LILL, 2014), que afeta mais de 2,5 milhões de pessoas em todo o mundo (MILO & KAHANA, 2010). A EM é a principal causa de incapacidade neurológica crônica em adultos jovens (20-40 anos), tendo, portanto, um forte impacto socioeconômico (CORES *et al.*, 2014). Apesar de a doença poder seguir diferentes cursos após o diagnóstico definitivo, a maioria dos pacientes com EM (85% - 90%) apresenta a forma recorrente-remitente (RR), caracterizada por recaídas clínicas seguidas de remissões (DECK *et al.*, 2013).

Fatores intrínsecos ou extrínsecos, como o estresse psicológico, podem aumentar o risco de desenvolvimento de doenças autoimunes (DECK *et al.*, 2013). O estresse é qualquer injúria externa ou interna que seja capaz de interferir na homeostase, que é a manutenção do equilíbrio interno necessário para a sobrevivência do ser humano (SELYE, 1977). No contexto da EM, estudos indicam que eventos psicológicos adversos podem servir como gatilhos para o desenvolvimento da doença e/ou recaídas clínicas (MOHR *et al.*, 2004; SCHUMANN *et al.*, 2012).

Os mecanismos pelos quais o estresse funciona como fator de risco para o estabelecimento e agravamento da EM são múltiplos e ainda pouco explorados em suas bases moleculares. Um efeito deletério direto refere-se à capacidade do estresse em aumentar a permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE), o que pode acarretar um aumento na infiltração de células imunes periféricas para o parênquima cerebral (KIM, 2012), local da auto-agressão na EM. Ademais, quando presentes no parênquima cerebral, as células imunes migrantes entram em contato com neurotransmissores e, uma vez expressando receptores para essas moléculas, ficam sujeitas à imunomodulação.

Um dos diagnósticos mais comuns relacionados aos transtornos de humor em pacientes com EM é a depressão. A depressão apresenta um impacto negativo severo em pessoas com EM (WATSON *et al.*, 2014), uma vez que pode prejudicar componentes chaves da imunidade celular, tornando o indivíduo não apenas mais susceptível a doenças infecciosas (BENTON *et al.*, 2010), como também influenciar o curso clínico da doença (KIM, 2012).

Muitos dos efeitos deletérios da depressão na imunidade estão atrelados a distúrbios na produção de importantes neurotransmissores, tal como a serotonina (5-HT – 5-hidroxitriptamina), que tem sido implicada na fisiopatologia da depressão. Sabe-se que linfócitos T são capazes de expressar diferentes subtipos de receptores para a 5-HT (STEFULJ *et al.*, 2000; KHAN & GHIA, 2010; SNIR *et al.*, 2013), mas até o momento nenhum trabalho foi conduzido na tentativa de investigar os efeitos da 5-HT sobre o *status* funcional da célula mais implicada na EM, os linfócitos T. Esse tipo de estudo é importante, pois fornece informações que podem ajudar no manejo clínico multidisciplinar dos pacientes.

1.2 – Sistema Imune

O Sistema Imune (SI) é composto por diversas células e moléculas que têm, como principal função, a proteção contra microorganismos infecciosos e substâncias estranhas não infecciosas. Diante de potenciais ameaças, essas células podem desencadear respostas que, normalmente, culminam na eliminação ou no confinamento dos invasores indesejáveis. De modo geral, existem dois grandes grupos de elementos celulares que compõem o sistema imune: as células da imunidade natural (como, por exemplo, fagócitos e células desgranuladoras) e da imunidade adaptativa (linfócitos T e B clássicos). A imunidade natural é a primeira frente de combate em uma resposta imune primária, sendo executada principalmente por fagócitos. A ação imune tardia, executada pelas células da imunidade adaptativa, é fundamental para o controle desses invasores. Porém, na dinâmica da resposta imune, a intensa interação que ocorre entre os dois tipos de imunidade é necessária para garantir maior sucesso contra o invasor.

1.2.1 – Ativação e diferenciação de linfócitos T efetores: papel das células dendríticas

Os linfócitos T podem expressar moléculas de superfície, como, por exemplo, CD4 e CD8 (CD – grupo de diferenciação, do inglês *Cluster of differentiation*), permitindo, dessa forma, dividi-los em dois grandes grupos: os linfócitos TCD4⁺ e os TCD8⁺.

Os linfócitos TCD4⁺ ocupam uma posição de destaque, pois regulam a função de todas as outras células do sistema imune no combate aos agentes infecciosos. Essas células, por exemplo, são fundamentais tanto na resposta imune humoral mediada pelas células B quanto na ativação dos linfócitos TCD8⁺. Adicionalmente, a função das células da imunidade natural é normalmente regulada positivamente por diferentes citocinas liberadas pelas células T CD4⁺ efectoras.

Os linfócitos T, para efetuarem suas funções, dependem de sinais cognitivos e solúveis liberados por um conjunto de células da imunidade natural conhecidas como células apresentadoras de antígeno (APCs – do inglês *antigen presenting cells*), especialmente as células dendríticas (DCs – do inglês *dendritic cells*).

As DCs originam-se de precursores na medula-óssea e residem em vários tecidos e órgãos. Quando comparada à outras células do sistema imune inato, as DCs apresentam biologia mais complexa (BONASIO & VON ADRIAN, 2006; HUGUES *et al.*, 2006). Essas células são divididas em duas sub-populações: as DCs mieloides (mDC) e plasmocitoides (pDC), que diferem na origem e nos marcadores de superfície que são expressos. As pDCs expressam CD11c, o CD11b e o CD8 α (CD11c⁺CD11b⁺CD8 α ⁺); já as mDCs expressam altos níveis de CD11c e não apresentam o CD11b e o CD8 α (CD11c^{high}CD11b⁻CD8 α ⁻) (BONASIO & VON ADRIAN, 2006; HUGUES *et al.*, 2006). Entretanto, independente de sua origem, as DCs imaturas possuem capacidade de internalizar e processar antígenos, mas apresentam pouca habilidade de ativar células T *naïves*/virgens. Todavia, ao reconhecerem diferentes agonistas dos receptores do tipo Toll (TLR – do inglês *Toll-like receptors*), ou citocinas inflamatórias como a interleucina (IL)-1 β , o fator α de necrose tumoral (TNF- α) ou o interferon (IFN)- γ , essas células se tornam APCs eficientes, sendo então capazes de ativar células T *naïves* (WATTS *et al.*, 2007).

Por expressarem diferentes tipos de TLRs, as pDCs e mDCs respondem a tipos diferentes de antígenos, conhecidos como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs – do inglês *Pathogen-associated molecular patterns*). Nesse sentido, enquanto as pDCs expressam altos níveis de TLR-7 e TLR-9, que reconhecem material genético de vírus e de bactérias, respectivamente (CAO & LIU, 2007), as mDCs, por exemplo, expressam níveis elevados de TLR-4, capacitando-as a responder a patógenos de composição glicolipídica, polissacarídica ou glicopolissacarídica, como o lipopolissacarídeo (LPS) presente na parede celular de bactérias gram-negativas (CARBONE & HEATH, 2003). Logo, o tipo de resposta imune mediada pelas células T clássicas é grandemente influenciada pela expressão diferencial desses receptores, como por exemplo, a ativação das pDCs com agonistas do TLR7, que induz a secreção dos interferons do tipo I (IFN- α e IFN- β), que são fundamentais na resposta imune contra vírus e células neoplásicas (CARBONE & HEATH, 2003; CAO & LIU, 2007; FAZILLEAU *et al.*, 2007).

Os linfócitos são ativados na região paracortical dos gânglios linfáticos, uma vez que as DCs saem do sítio de inflamação para apresentar o antígeno ao linfócito T. Durante essa migração, as DCs amadurecem, passando a expressar diferentes moléculas de superfície que são necessárias para a apresentação de antígenos e ativação e diferenciação de linfócitos T. A ativação dessas células requer uma zona de forte aderência – a sinapse imunológica – que envolve reorganização do citoesqueleto e redistribuição focal do complexo Ag-MHC e moléculas coestimulatórias, maximizando a interação entre DCs e linfócitos ao formar uma plataforma estável para o recrutamento e exposição de moléculas de sinalização (O'CONNEL *et al.*, 2006)

Com relação à ativação dos linfócitos TCD4⁺, para que esta ocorra, são necessários dois sinais. O primeiro sinal corresponde à apresentação de peptídeos antigênicos acoplados às moléculas do MHC de classe II aos receptores de célula T (TCR – *T cell receptor*) antígeno-específico (DUSTIN *et al.*, 2006). O segundo sinal é a ligação da molécula CD28, receptor de superfície constitutivo dos linfócitos T, às moléculas da família B7 (CD80/CD86), expressas na superfície das DCs maduras. Esses sinais são suficientes para promover a linfoproliferação, já que são capazes

de induzir a produção e secreção de IL-2 pelos linfócitos TCD4⁺ antígenos-específicos (DUSTIN *et al.*, 2006; HENRICKSON & VON ADRIAN, 2007).

Para a diferenciação das células TCD4⁺, após a expansão clonal, um terceiro sinal faz-se necessário. Esse sinal é principalmente mediado pela secreção de mediadores solúveis pelas DCs, que conduzem à diferenciação dos linfócitos T ativados em diferentes fenótipos (figura 1) capazes de secretar padrões diferentes de citocinas, que irão regular e coordenar as respostas imunes.

Apesar de as citocinas liberadas pelas DCs serem os principais mediadores solúveis que auxiliam ou determinam a diferenciação dos linfócitos TCD4⁺, vários estudos apontam também um envolvimento de hormônios e neurotransmissores em auxiliar na diferenciação do fenótipo final (TAN *et al.*, 2015; PROCACCINI *et al.*, 2015; WEINSTEIN *et al.*, 2015).

Nesse contexto, sob a ação da citocina IL-12 secretada pelas mDCs o fator transcricional T-bet (do inglês *T-box transcription factor*) induz, nas células T, a diferenciação em células T auxiliares do tipo 1 (Th1 – *T helper 1*) (FAZILLEAU *et al.*, 2007; HENRICKSON & VON ADRIAN, 2007; ZHU *et al.*, 2010b). O fenótipo Th1 secreta grandes quantidades de IFN- γ e IL-2, realizando a resposta imune celular, fundamental no combate a microorganismos intracelulares obrigatórios ou facultativos por aumentar a ativação de fagócitos, células assassinas naturais (células NK – *natural killer*) e dos linfócitos T CD8⁺. O IFN- γ , secretado pelas células Th1, também induz a produção e secreção de IgG1 e IgG3 pelos linfócitos B humanos (MCKINSTRY *et al.*, 2010).

Na presença de níveis elevados de IL-4 produzidos pelas mDCs, os linfócitos TCD4⁺ diferenciam-se em células T auxiliares do tipo 2 (Th2 – *T helper 2*), através da indução do fator de transcrição GATA-3 (GATA-3 – do inglês *trans-acting T-cell-specific transcription factor*) (ZHU *et al.*, 2010b). Esses linfócitos, ao secretarem IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13, induzem a produção e secreção de anticorpos da classe IgE que participam da resposta imune envolvida no combate às infestações por helmintos e nas reações de hipersensibilidade do tipo I (MAKANI *et al.*, 2008; ZHU *et al.*, 2010b).

A ativação do fator de transcrição RORC (do inglês *RAR-related orphan receptor C*), através da liberação de TGF- β mais IL-23 pelas mDCs, tem sido implicada na indução do fenótipo Th17 em humanos (MATSUZAKI & UMEMURA, 2007; GUTCHER & BECHER, 2007). Os linfócitos Th17 quando ativados sintetizam não apenas IL-17, mas também, IL-21 e IL-22, que têm como principal função induzir as células imunes e parenquimatosas a secretarem IL-8, principal quimiocina envolvida no recrutamento de neutrófilos para o local da infecção (CROZAT *et al.*, 2009; MIOSSEC, 2009). As células Th17 também auxiliam na ativação de plasmoblastos produtores de IgG (ANNUNZIATO *et al.*, 2007). Entretanto, no contexto de doenças autoimunes, novos estudos têm demonstrado o envolvimento de um subtipo de células Th17, conhecidas como células Th17 patogênicas, produtoras de IL-17 e INF- γ , que parece ser induzida na presença de IL-1 β , IL-6 e IL-23, associada a ausência da citocina TGF- β (SHI *et al.*, 2010; PETER *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2015).

Recentemente um novo subtipo de células TCD4⁺ foi descoberto, as células T auxiliares 22 (Th22), que tem, como fator de transcrição, o receptor hidrocarbono aril (AHR - do inglês *aryl hydrocarbon receptor*) (AZIZI *et al.*, 2015). Essas células caracterizam-se por secretar altos níveis de IL-22, mas não de IL-17 e INF- γ (MIRSHAFIEY *et al.*, 2015). Apesar das células Th17 produzirem IL-22, as células Th22 parecem regular aspectos únicos da resposta imune em tecidos epiteliais, tal como estimulação da proliferação dessas células de revestimento (WAWRZYNIAK *et al.*, 2016). Esse fenótipo tem sido implicado em várias doenças autoimunes, tal como, por exemplo, a psoríase e a EM (AZIZI *et al.*, 2015; MIRSHAFIEY *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2015; WING *et al.*, 2015).

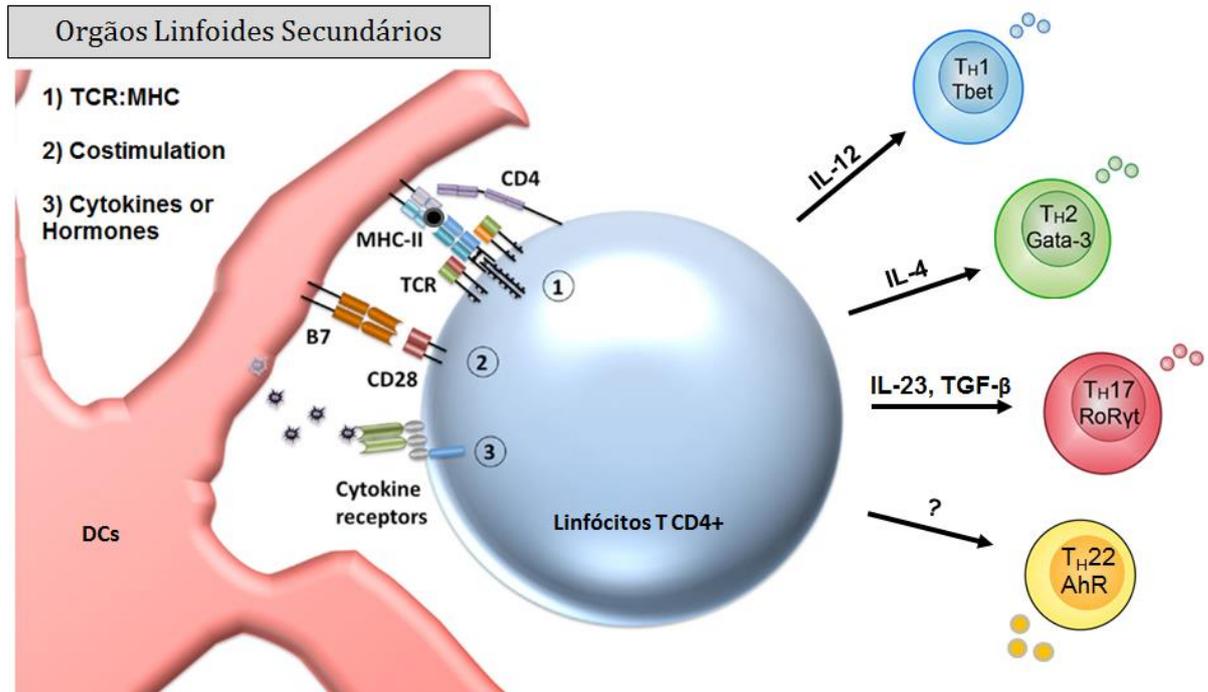


Figura 1. Eventos envolvidos na diferenciação das principais células T CD4⁺ efectoras. Durante o processo natural de ativação da resposta imune específica mediada pelas células T CD4⁺, as células dendríticas (DCs) profissionais (imunogênicas) apresentam diferentes peptídeos de proteínas antigênicas no contexto das moléculas do MHC de classe II. Durante essa sinapse imunológica, moléculas co-estimuladoras expressas na superfície das DCs, particularmente CD80 e CD86, interagem com o marcador CD28 expresso nas células T CD4⁺, permitindo, assim, a indução de diferentes vias de sinalização que culminam na proliferação e diferenciação desses linfócitos em diferentes fenótipos que produzem um conjunto polarizado de citocinas pró-inflamatórias. Nesse contexto, enquanto a diferenciação das células T CD4⁺ humanas no fenótipo Th1 depende, principalmente, da produção de IL-12 pelas DCs; a formação dos fenótipos Th2 e Th17 é principalmente garantida quando elevadas concentrações de IL-4 e IL-23 mais TGF- β , respectivamente, são liberadas por essa célula apresentadora de antígeno. Mais recentemente, descobriu-se um novo subtipo linfócitos TCD4⁺, capazes de produzir IL-22 – as células Th22, cujo fator de transcrição é o receptor hidrocarbono aril (AHR - aryl hydrocarbon receptor). Fonte: Adaptado de Russ, B.A. *et al.*, 2013 / O'Donnell, H. & McSorley, S.J., 2014 por SACRAMENTO, P.M.; MONTEIRO, C. & BENTO, C.A.M.

Os linfócitos TCD8⁺ são particularmente importantes no combate aos vírus. A ativação e a diferenciação dessas células depende da apresentação de peptídeos antigênicos acoplados às moléculas do MHC de classe I expressos na superfície das APCs profissionais, particularmente das pDCs. Quando ativadas, essas células se tornam linfócitos T citotóxicos (CTL – *cytotoxic T lymphocytes*), passando a produzir granzimas e perforinas, e são capazes de levar as células infectadas à apoptose, através da secreção coordenada desses produtos estocados nos grânulos citoplasmáticos (COQUERELLE & MOSER, 2010). Assim como os linfócitos TCD4⁺, essas células são capazes de se diferenciar em fenótipos efetores distintos (figura 2), secretando diferentes padrões de citocinas.

Por produzir altas concentrações de IFN- γ , as células TCD8⁺ são capazes também de amplificar a resposta Th1, sendo, por isso, também chamadas de Tc-1 (T *cytotoxic* 1) (OBAR & LEFRANÇOIS, 2010). De modo interessante, os linfócitos Th1, ao produzirem IL-2, também auxiliam os linfócitos TCD8⁺ a se tornarem citotóxicos e a se transformarem em células de memória (HUSTER, STEMBERG & BUSH, 2006).

Os linfócitos Tc-2, caracterizado pela expressão de GATA3 e consequente produção de IL-4 e IL-5, apresentam forte citotoxicidade coexistindo com uma resposta mediada por anticorpo tipo 2 (MOSMANN *et al.*, 1997; CERWENKA *et al.*, 1999).

Algumas células TCD8⁺ parecem executar função mais reguladoras, tal como o subtipo induzido por células dendríticas CX3CR1⁺ (CHANG *et al.*, 2013). Essas células T são capazes de produzir IL-9 e inibir a ativação de células TCD4⁺ antígeno-específico de maneira dependente de IL-10, conseguindo assim prevenir a inflamação intestinal mediada por células TCD4⁺ (CHANG *et al.*, 2013).

Finalmente, existem células TCD8⁺ que produzem IL-17, as Tc-17. Essas células também são capazes de produzir as citocinas inflamatórias IL-21 e TNF- α (LIU *et al.*, 2007; YEN *et al.*, 2009; HAMADA *et al.*, 2009). A IL-22 também pode ser produzida independente da produção de IL-17 pelas células TCD8⁺, as células Tc-22. Essas células têm sido encontradas na epiderme de pacientes com psoríase (HAMADA *et al.*, 2009; CIRIC *et al.*, 2009; RES *et al.*, 2010).

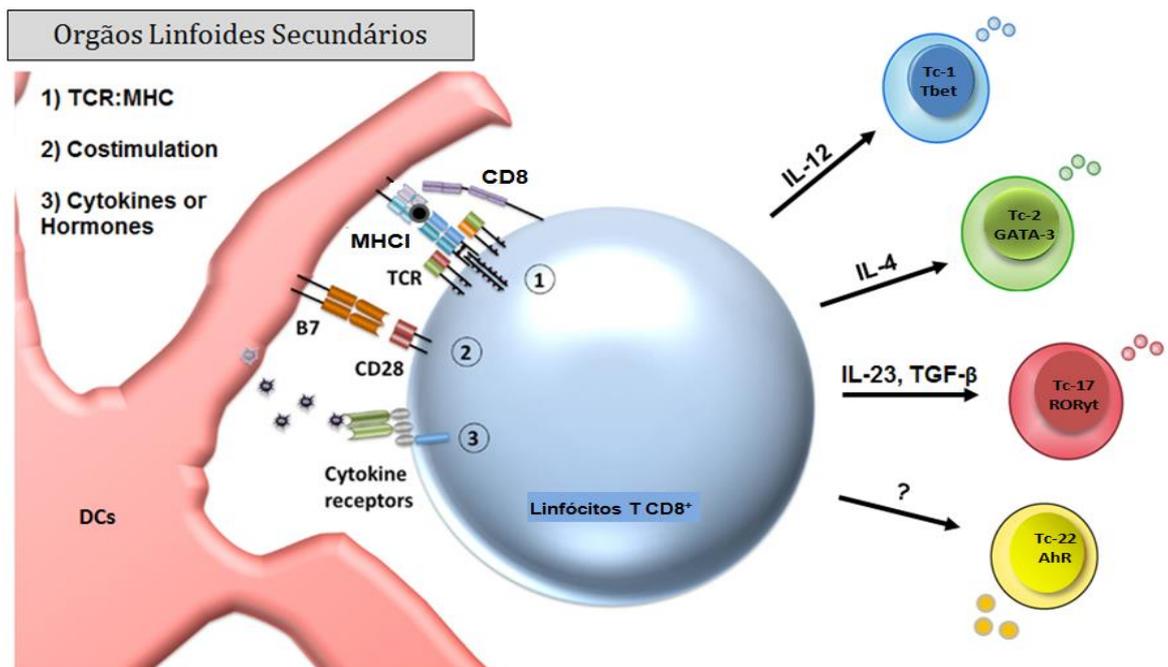


Figura 2. Eventos envolvidos na diferenciação das principais células T CD8⁺ efectoras. Durante o processo natural de ativação da resposta imune específica mediada pelas células T CD8⁺, as células dendríticas (DCs) profissionais (imunogênicas) apresentam diferentes peptídeos de proteínas antigênicas no contexto das moléculas do MHC de classe I. Durante essa sinapse imunológica, moléculas co-estimuladoras expressas na superfície das DCs, particularmente CD80 e CD86, interagem com o marcador CD28 expresso nas células T CD8⁺, permitindo, assim, a indução de diferentes vias de sinalização que culminam na proliferação e diferenciação desses linfócitos em diferentes fenótipos que produzem um conjunto polarizado de citocinas pró-inflamatórias. Nesse contexto, enquanto a diferenciação das células T CD8⁺ humanas no fenótipo Tc1 depende, principalmente, da produção de IL-12 pelas DCs; a formação dos fenótipos Tc2 e Tc17 é principalmente garantida quando elevadas concentrações de IL-4 e IL-23 mais TGF-β, respectivamente, são liberadas por essa célula apresentadora de antígeno. Mais recentemente, descobriu-se um novo subtipo linfócitos TCD8⁺, capazes de produzir IL-22 – as células Tc22, cujo fator de transcrição é o receptor hidrocarbono aril (AHR - aryl hydrocarbon receptor). Fonte: Adaptado de Russ, B.A. *et al.*, 2013 / O'Donnell, H. & McSorley, S.J., 2014 por SACRAMENTO, P.M.; MONTEIRO, C. & BENTO, C.A.M.

Apesar de muitos desses fenótipos de células T participarem da proteção contra diferentes patógenos, a desregulação no comportamento dessas células tem sido associada a doenças autoimunes.

1.2.2 – Regulação da resposta imune: os linfócitos T reguladores

As respostas imunes necessitam ser reguladas, pois, caso contrário, podem favorecer o desenvolvimento de doenças imunomediadas (CONSTANTINO, BAECHER-ALLAN & HAFNER, 2008). Sabe-se que as respostas Th1 e, principalmente, Th17 quando exacerbadas estão envolvidas no desenvolvimento de

várias doenças autoimunes (ZAGHOUBANI *et al.*, 2009), e que as citocinas secretadas pelos linfócitos Th2 estão fortemente relacionadas às reações alérgicas mediadas pela IgE (MCKINSTRY *et al.*, 2010). Nesse contexto, sabe-se que os linfócitos T reguladores (Tregs) são as células mais importantes na manutenção da homeostase, portanto, do controle das respostas inflamatórias (VIGNALI *et al.*, 2008). Qualquer deficiência na função ou no número das células Tregs, pode elevar o risco de doenças autoimunes, tal como a EM.

Os linfócitos Tregs são formados por distintas subpopulações, porém todos apresentam uma hiporresponsividade a estímulos antigênicos e funções imunossupressoras (figura 3) (SAITO *et al.*, 2007). Dois subtipos desses linfócitos têm destaque: os linfócitos TCD4⁺ reguladores do tipo 1 (Tr-1) e os linfócitos TCD4⁺ reguladores [naturais (nTreg) e induzidos (iTregs)] (ALUVIHARE *et al.*, 2004; SAITO *et al.*, 2007).

As nTreg originam-se no timo e expressam o fator transcricional FOXP3 (FOXP3 – *forkhead winged helix*) no citosol, responsável por regular a expressão de uma via de sinalização envolvida na supressão da inflamação (SHEVACH *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2006). Na superfície, essas células expressam grandes quantidades da cadeia α do receptor para IL-2 (CD25) e ausência do marcador CD127, o receptor para IL-7 (LIU *et al.*, 2006). Essas células, induzidas pelas DCs tolerogênicas (tDCs), são capazes de suprimir a proliferação e a função dos linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ efetores por diversas maneiras, como a produção e secreção das citocinas anti-inflamatórias, IL-10, IL-35 e TGF- β (TGF- β – *transforming growth factor- β*) (DIECKMANN *et al.*, 2001; LEVINGS, SANGREGORIO & RONCAROLO, 2001; STEPHENS *et al.*, 2001; PICCIRILLO & SHEVACH, 2001; GROHMANN *et al.*, 2002; WING *et al.*, 2002; FALLARINO *et al.*, 2003; NAKAMURA *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2009).

Além dos linfócitos nTreg, muitos artigos demonstraram que células do tipo nTreg-símiles, também conhecidas como iTreg (do Inglês *induced T regulatory cells*), podem provir de linfócitos T CD4⁺CD25⁻ virgens ativadas pelas DCs produtoras de TGF- β (FANTINI *et al.*, 2004; POLANCZYK *et al.*, 2004; WALKER *et al.*, 2005; POLANCZYK *et al.*, 2006; TAI *et al.*, 2008). Essas iTreg apresentam o mesmo fenótipo das nTregs e, quando ativadas, inibem as respostas inflamatórias tanto por

contato, através do CTLA-4 (CD152), como também pela liberação de grandes quantidades de TGF- β e IL-10 (POLANCZYK *et al.*, 2006; TAI *et al.*, 2008).

Os linfócitos Tr-1 representam outra subpopulação que está envolvida na regulação da resposta imune. Essas células diferenciam-se pela secreção de IL-10 pelas tDCs que expressam a enzima indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO), responsável pela degradação de triptofano, aminoácido essencial na indução da resposta imune celular mediada pelas células Th1 (MAHNKE & ENK, 2005; PENNA, GIARRATANA & AMUCHASTEGUI, 2005). Fenotipicamente, as células Tr-1 em humanos são identificadas pela coexpressão de CD49b e LAG-3 e pela produção de elevados níveis de IL-10, principalmente quando ativadas via TCR (RONCAROLO *et al.*, 2001; LEVINGS, SANGREGORIO & SARTIRANA, 2002; GAGLIANI *et al.*, 2013). A maioria desses linfócitos T são CD4⁺, mas já foram descritos linfócitos CD8⁺ Tr-1-símiles (STEINBRINK *et al.*, 1999).

Um dos subtipos de células TCD8⁺ é capaz de suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias através da produção de IL-10 – as TCD8⁺ regs (ENDHARTI *et al.*, 2005), originalmente descritas por Gershon e Kondo (1970). Em humanos, a disfunção dessas células tem sido associada ao desenvolvimento de doenças autoimunes, como por exemplo, a EM e a diabetes do tipo 1 (SMITH & KUMAR, 2008; JIANG *et al.*, 2010).

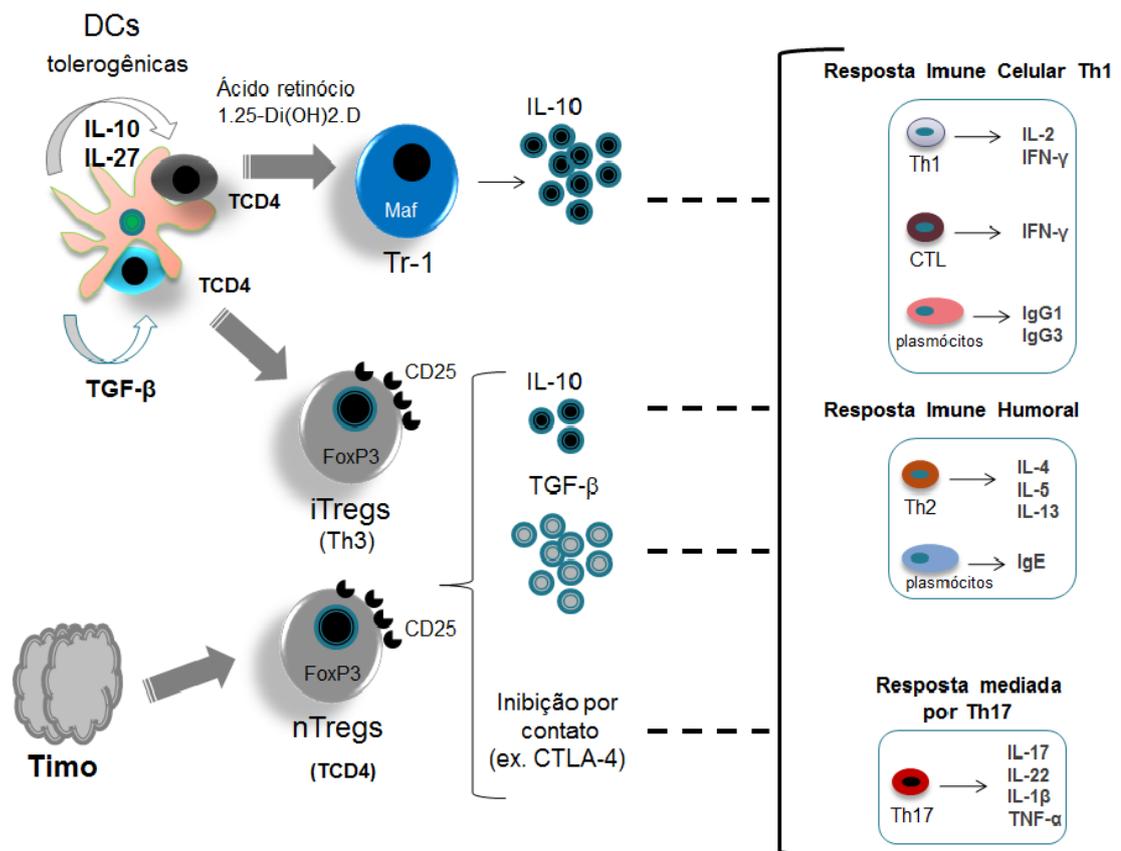


Figura 3. As células T reguladoras e a homeostase imune. Durante as respostas imunes inflamatórias, a produção excessiva de citocinas pelas células Th1 e Th17 patogênicas tem sido atrelada à distúrbios na rede de regulação, principalmente executada pelos linfócitos T reguladores (Tregs). As células Tregs representa uma subpopulação de células T CD4⁺ relativamente heterogênea, sendo as células T CD4⁺ FOXP3⁺ CD25⁺ o subtipo mais estudado nas doenças autoimunes. Essas células podem ser tanto induzidas (iTregs) na periferia quando reconhecem os peptídeos específicos apresentados pelas células dendríticas (DCs) tolerogênicas, quanto geradas naturalmente no timo (nTregs). A terceira subpopulação é induzida por DCs tolerogênicas na presença do metabólito da vitamina D [1,25(OH)2D] ou do ácido retinóico. Essas células, conhecidas como células Tr-1, são negativas para o FOXP3 mas expressam elevados níveis do fator de transcrição Maf. Os mecanismos de ação executados pelas células para controlar reações inflamatórias são diversos e envolvem a inibição por contato com a célula alvo efetora (iTreg e nTregs) e/ou a liberação de citocinas anti-inflamatórias, particularmente IL-10 e TGF-β. Fonte: SACRAMENTO, P.M; MONTEIRO, C. & BENTO, C.A.M.

1.3 – Esclerose Múltipla

1.3.1 – A doença

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença autoimune inflamatória crônica que afeta o SNC, composto pelo encéfalo e medula espinhal, podendo afetar também os nervos ópticos (SOSPEDRA & MARTIN, 2005). A doença leva à desmielinização da bainha de mielina dos neurônios, afetando a transmissão do impulso nervoso, uma vez que a bainha é requerida para a eficiência da função (ADAMS & VICTOR, 1989). A inflamação persistente leva à degeneração axonal secundária com atrofia cerebral conforme a doença progride (SUPPIEJ & CAINELLI, 2014).

É uma das doenças neurológicas mais comuns, com prevalência de 0,5 a 1%, e atinge mais de 2,5 milhões de indivíduos no mundo (MILO & KAHANA, 2010; LILL, 2014). No Brasil, dados da Associação Brasileira de Esclerose Múltipla (ABEM) registram uma prevalência de mais de 35.000 indivíduos com a doença (ABEM, 2014). Causada pela combinação de fatores de riscos genéticos e ambientais, a EM é uma doença complexa (LILL, 2014).

A doença afeta principalmente pessoas com idade entre 20 e 40 anos, tendo um forte impacto na qualidade de vida desses indivíduos (LEVIN *et al.*, 2014). Apesar da menor incidência, a EM pode ocorrer durante a infância ou na adolescência – até 5% dos pacientes que sofrem com a EM (SUPPIEJ & CAINELLI, 2014). A doença segue diferentes cursos em crianças e adultos, devido a características intrínsecas desses grupos. A EM é mais comum em caucasianos do que em outros grupos étnicos e as mulheres são, aproximadamente, 2 vezes mais afetadas do que os homens (ALVES-LEON *et al.*, 2008; ABEM, 2014; KOCH *et al.*, 2014).

A manifestação da EM se dá com vários sinais e sintomas de incapacidade neurológica, incluindo perda sensorial, neurite óptica, fraqueza motora, diplopia e ataxia dos membros, bem como um maior risco de estresse, ansiedade e depressão (LEVIN *et al.*, 2014). As manifestações de perdas motoras e visuais são as que mais despertam o interesse em procurar atendimento médico nesses indivíduos.

Nos pacientes, a síndrome clínica isolada (CIS – do inglês *Clinically isolated syndrome*) é a primeira manifestação da doença e se apresenta com desmielinização compatível com EM, porém não cumpre critérios de disseminação no tempo; e - a síndrome radiológica isolada (RIS – do inglês *Radiologically isolated syndrome*), que é mais complicada porque apresenta características na ressonância magnética sugestiva de EM (desmielinização e inflamação no parênquima cerebral), mas sem sinais nem sintomas clínicos (LUBLIN *et al.*, 2014).

O curso clínico da EM pode ser considerado a expressão de dois fenômenos clínicos: surtos agudos dos sintomas neurológicos, que terminam com remissão parcial ou completa, e progressão, que se refere à piora irreversível dos sinais e sintomas por um período igual ou superior a 6 meses. Existe forte evidência de que os surtos sejam principalmente a expressão de inflamação aguda, focal, disseminada (no tempo e espaço) e recorrente no SNC.

Após o diagnóstico definitivo, a EM pode seguir três cursos, levando em consideração surtos, remissões e neurodegeneração: remitente-recorrente (EM-RR), progressiva primária (EM-PP) ou progressiva secundária (EM-PS). A forma EM-RR é a mais comum, sendo diagnosticada em mais de 80% dos casos e caracteriza-se por apresentar episódios agudos (surtos) de comprometimento neurológico com duração mínima de 24 horas e intervalo de, no mínimo, trinta dias entre cada surto (SCHUMACHER *et al.*, 1965). A forma EM-PP caracteriza-se por um curso progressivo, isto é, ausência de remissão, logo após a primeira manifestação da doença, e não tem tratamento disponível até o momento (DECK *et al.*, 2013). A forma EM-PS é considerada a progressão da forma EM-RR, que evolui de uma forma mais inflamatória e mais responsiva ao tratamento para uma forma secundária progressiva, neurodegenerativa e refratária ao tratamento, sem que o fator que leva a progressão secundária seja conhecido. Aproximadamente 50% dos pacientes da forma remitente-recorrente convertem para esta forma após 5 a 15 anos de doença (LUBLIN *et al.*, 2014).

Com base na evolução, os pacientes com EM são estadiados de acordo com a avaliação dos sistemas funcionais (FS – do inglês *functional systems*) (Quadro 1) utilizando-se a escala chamada Escala do Estado de Disabilidade Expandida (EDSS – do inglês *Expanded Disability Status Scale*) (Quadro 2), que mede o grau

de incapacidade neurológica do paciente (KURTZKE, 1983). Essa escala é composta por vinte itens com valores de 1 a 10, sendo que a pontuação aumenta em meio ponto conforme o grau de incapacidade do paciente aumenta. O maior enfoque dado é a capacidade de deambulação do paciente, principalmente se o EDSS for maior que 4. Nessa escala, 0 indica paciente sem déficit neurológico enquanto que 10 indica morte em decorrência da EM, sendo esse evento muito raro.

Quadro 1. Os sistemas funcionais avaliados no âmbito da Escala Expandida do Estado de Incapacidade (EDSS – do inglês *Expanded Disability Status Scale*)

✓	Funções Piramidais - movimentos voluntários
✓	Funções do Tronco Cerebral - movimento dos olhos, sensação e movimento da face e deglutir
✓	Funções Visuais (ou Ópticas)
✓	Funções Cerebrais (ou Mentais) - memória, concentração, humor
✓	Funções Sensitivas
✓	Funções Intestinais e Vesicais
✓	Outras Funções - incluindo a fadiga

Fonte: Chaves, M.L.F., Finkelsztein, A., Stefani, M.A. Rotinas em Neurologia e Neurocirurgia. Porto Alegre. Artmed, 2008. Capítulo "Escala em Neurologia".

Quadro 2. Escala Expandida do Estado de Incapacidade (EDSS)¹

0.0	- Exame neurológico normal (FS grau 0).
1.0	- Nenhuma deficiência, sinais mínimos em 1 FS (1 FS 1).
1.5	- Nenhuma deficiência, sinais mínimos em 1 FS, excluindo função cerebral grau 1 (mais de 1 FS 1).
2.0	- Deficiência mínima em 1 FS (1 FS 2, outros 0 ou 1).
2.5	- Deficiência mínima em 2 FS (2 FS 2, outros 0 ou 1).
3.0	- Deficiência moderada em 1 FS (1 FS 3, outros 0 ou 1) ou deficiência leve em 3 ou 4 FS (3 ou 4 FS 2, outros 0 ou 1), embora com marcha livre.
3.5	- Marcha livre, mas com deficiência moderada em 1 FS (1 FS 3) e 1 ou 2 FS 2, ou 2 FS 3, ou 5 FS 2 (outros 0 ou 1).
4.0	- Marcha livre sem órtese, independente, por 12 h/dia apesar de deficiência relativamente severa de 1 FS 4 (outros 0 ou 1) ou combinações de graus menores excedendo os limites dos passos anteriores, capaz de andar sem auxílio e sem descanso por 500 metros.
4.5	- Marcha livre sem auxílio durante grande parte do dia, capaz de trabalhar o dia todo, pode, contudo, ter alguma limitação para atividade livre ou requerer mínima assistência; caracterizado por deficiência relativamente severa consistindo de 1 FS 4 (outros 0 ou 1) ou combinações de

	graus menores e marcha livre por 300 metros.
5.0	- Marcha livre por 200 metros; deficiência severa atrapalhando as atividades diárias; geralmente 1 FS 5 (outros 0 ou 1) ou combinações de graus menores.
5.5	- Marcha livre por 100 metros; deficiência severa para impedir as Atividades de Vida Diária (AVD), (1 FS 5, outros 0 ou 1).
6.0	- Auxílio intermitente ou unilateral (bengala, muleta, aparelho tutor, órtese) necessário para andar 100 metros com ou sem descansar (+ de 2 FS 3).
6.5	- Auxílio bilateral constante para andar 20 metros (+ de 2 FS 3).
7.0	- Incapaz de andar 5 metros mesmo com auxílio, necessita de cadeira-de-rodas (CR) comum e faz transferência sozinho, toca a CR por 12 h/dia (= de 1 FS 4; muito raramente só 1 FS 5).
7.5	- Incapaz de andar mais que poucos passos, restrito à CR, pode precisar de auxílio para transferência, toca a CR, mas não pode se manter na CR comum o dia todo. Pode necessitar de CR motorizada (+ de 1 FS 4+).
8.0	- Essencialmente restrito ao leito ou CR, pode ficar na CR boa parte do dia, mantém muitos cuidados pessoais, geralmente tem o uso efetivo dos membros superiores (FS 4 em muitos sistemas).
8.5	- Restrito ao leito boa parte do dia, tem alguma função de membros superiores; mantém alguns cuidados pessoais (FS 4 em vários sistemas).
9.0	- Dependente no leito; pode se comunicar e se alimentar (FS 4 na maioria).
9.5	- Totalmente dependente no leito, incapaz de deglutir ou se alimentar (todos os FS 4 ou 5).
10,0	- Morte por Esclerose Múltipla

¹ (do inglês *Expanded Disability Status Scale*) Fonte: Chaves, M.L.F., Finkelsztejn, A., Stefani, M.A. Rotinas em Neurologia e Neurocirurgia. Porto Alegre. Artmed, 2008. Capítulo "Escala em Neurologia".

Apesar da etiologia ser desconhecida, a EM é caracterizada por lesões multifocais no SNC associadas a infiltração de células do sistema imune e que causam desmielinização, degeneração axonal e perda dos oligodendrócitos (ADAMS & VICTOR, 1989; FASSAS & MANCARDI, 2008; VOSOUGHI & FREEDMAN, 2010; KIESEIER, 2014). As lesões podem ser identificadas macroscopicamente por ressonância magnética (RM) do crânio como placas cinzas, de tamanhos variados e com limites imprecisos, além de se notar atrofia cerebral com alargamento dos ventrículos laterais (ADAMS & VICTOR, 1989; MINGUETTI, 2001).

1.3.2 – Imunopatologia

Estudos conduzidos em amostras de necropsia de tecido cerebral e medular de pacientes com EM revelaram um acúmulo perivascular de células T oligoclonais – linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺, monócitos e células B ocasionais (plasmócitos infrequentes) e anticorpos específicos contra a mielina (ESIRI, 1977; MATTSON, ROOS & ARNASON, 1980; GENAIN *et al.*, 1999; revisto por STEINMAN, 2001).

Acredita-se que diferentes eventos ambientais favoreçam, em indivíduos geneticamente predisponentes, a perda da tolerância e, portanto, a ativação das células T mielinas-específicas, ou seja, que atacam proteínas que compõem a bainha de mielina e proteínas dos oligodendrócitos, células que produzem a mielina. Estudos em modelo experimental da doença em camundongos, designada como encefalomielite autoimune experimental (EAE – do inglês *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*) têm permitido grandes avanços em nosso conhecimento acerca dos mecanismos moleculares e celulares atrelados à doença nos seres humanos.

Nos camundongos, a indução de EAE depende da ativação dos linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ autorreativos contra antígenos da bainha de mielina pelas DCs nos gânglios paracervicais (ANDO *et al.*, 1998). Esses linfócitos passam a expressar moléculas de adesão e receptores de quimiocina, permitindo que essas células invadam o parênquima encefálico (KEBIR *et al.*, 2009).

Acreditava-se que os linfócitos Th1 fossem os únicos responsáveis pela imunopatogenia da EAE e EM (YURA *et al.*, 2001), porém camundongos deficientes nos genes codificadores das citocinas relacionados a esse fenótipo (IL-12 e IFN- γ) desenvolveram uma forma mais agressiva da doença (LUBLIN *et al.*, 1993; FERBER *et al.*, 1996; WILLENBORG *et al.*, 1996; CHU, WITTMER & DALTON, 2000; BECHER, DURELL & NOELLE, 2002). Em contrapartida, camundongos deficientes em IL-23 ou em IL-6, citocinas cruciais para a diferenciação do fenótipo Th17 patogênico, eram resistentes a EAE (OKUDA *et al.*, 1998; CUA *et al.*, 2003; LANGRISH *et al.*, 2005). Essa resistência foi relacionada à incapacidade de se induzir a diferenciação das células T mielina-específicas em células Th17 (LIU *et al.*, 2008).

Alguns estudos clínicos têm demonstrado o envolvimento de células Th17 na imunopatologia da EM em humanos. Altos níveis de transcritos de RNA mensageiro

para a IL-17 foram detectados nas lesões crônicas desses pacientes (MATUSEVICIUS *et al.*, 1999; LOCK *et al.*, 2002; revisto por LOVETT-RACKE, YANG & RACKE, 2011). Ademais, estudo por Matusевичius e colaboradores (1999) demonstrou elevada produção de IL-17 e IL-6 pelas células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de pacientes com EM durante as recaídas clínicas. Um aumento na frequência de células Th17 no líquido durante os surtos clínicos também foi documentado em pacientes com EM (BRUCKLACHER-WALDERT *et al.*, 2009). Desta forma, esses estudos sugerem um maior envolvimento de células Th17 na EM.

Entretanto, em humanos, acredita-se que citocinas produzidas por Th1 também contribuam para o dano neuronal. No sangue periférico de pacientes com EM-RR em surto clínico, têm-se detectado não apenas níveis elevados de IL-12, citocina que induz o fenótipo Th1, como também uma relação direta entre as concentrações dessa proteína com o grau de déficit neurológico (SKURKOVICH *et al.*, 2001; BRUCKLACHER-WALDERT *et al.*, 2009). Portanto, no caso dos pacientes com EM, estudos sugerem que ambos os fenótipos de células TCD4⁺ (Th1 e Th17) contribuam diferentemente no curso da doença.

As células TCD8⁺, principalmente as Tc-1 e Tc17, também executam papel importante na imunopatologia da EM, durante os surtos e na fase neurogenerativa. Estudos demonstraram forte correlação entre o desenvolvimento de novas lesões no SNC com o nível de infiltração de células TCD8⁺ no parênquima cerebral e medular (BJARTMAR, WUJEK & TRAPP, 2003; SKULINA *et al.*, 2004).

Assim como em outras doenças autoimunes, deficiências no compartimento das células Tregs têm sido descritas em pacientes com EM. Apesar da maioria dos estudos não ter conseguido identificar uma diferença significativa na frequência de células Tregs no sangue periférico de indivíduos saudáveis e de pacientes (VENKEN *et al.*, 2007; MICHEL *et al.*, 2008), vários estudos têm revelado, no entanto, a incapacidade dessas células em inibir a proliferação e a produção de citocinas inflamatórias pelas células T efectoras específicas para proteínas da mielina (MICHEL *et al.*, 2008; VENKEN *et al.*, 2007, 2008; FALCON, 2009; MA *et al.*, 2009; SMOLDERS *et al.*, 2009). Essa deficiência funcional pode estar relacionada à menor expressão intracelular da proteína FOXP3 descrita nas células Tregs de pacientes

com EM (VENKEN *et al.*, 2007). Ademais, durante as recaídas clínicas, linfócitos T FOXP3⁺ representam o infiltrado minoritário dentre os leucócitos no cérebro de pacientes com EM (VENKEN *et al.*, 2007). A menor frequência dessas células no SNC durante o surto pode indicar falha delas em migrar para as áreas de lesão devido a não expressão de adressinas específicas, reduzida sobrevivência local ou mesmo transformação dessas em células potencialmente encefalitogênicas de fenótipo Th17 (VENKEN *et al.*, 2007).

De modo interessante, estudos por Michel e colaboradores (2008) e Medrado e colaboradores (2016) sugerem que falhas funcionais das células Tregs em controlar a reação inflamatória em pacientes com EM sejam indiretas, isto é, estejam relacionadas à elevada produção de citocinas inflamatórias, tais como IFN- γ e TNF- α , produzidos por linfócitos T efetores que expressam elevados níveis do receptor para a citocina IL-7, o CD127. Nesse estudo, a depleção *in vitro* dessas células CD4⁺CD127⁺⁺ permitiu que os linfócitos Tregs dos pacientes com EM fossem igualmente capazes, quando comparado a indivíduos saudáveis, de inibir resposta inflamatória mediada por células T efectoras. Esses resultados sugerem que, na verdade, deficiências nos mecanismos de regulação possam estar atreladas à elevada produção de citocinas inflamatórias durante as crises clínicas dos pacientes com EM, e que não há defeitos intrínsecos nos programas genéticos de indução e manutenção dessas células Tregs.

1.3.3 – Tratamento

A EM é uma doença de caráter crônico que atualmente não apresenta cura, porém existem estratégias que visam controlar os sintomas, prevenir a ocorrência de novos episódios de incapacidade neurológica e/ou alterar o curso da doença (em algumas formas, por exemplo, aumentar o tempo entre as recaídas). Dentre esses agentes podemos destacar os glicocorticoides, usados de forma terapêutica para controlar as crises agudas de incapacidade neurológica, e as terapias modificadoras da doença (TMD), usadas no período de remissão da doença e que têm como objetivo maior prevenir a ocorrência de novas atividades clínicas e radiológicas da doença, reduzindo o risco e a gravidade das recaídas clínicas. Adiciona-se a isso a

necessidade do tratamento multidisciplinar dos pacientes através de manobras que melhorem a qualidade de vida, tais como a reabilitação e apoio psicológico.

As TMD devem ser criteriosamente escolhidas, levando em consideração a individualidade do paciente, tal como a existência de comorbidades (FARBER & SAND, 2015). Dentre as TMD aprovadas para uso na EM temos os interferon (IFN) β -1a e -1b, acetato de glatirâmer, natalizumabe, fingolimoide, teriflunomida e o dimetil-fumarato (LINKER & GOLD, 2013). Nos Estados Unidos, os IFNs e o acetato de glatirâmer são considerados drogas de primeira linha, enquanto que fingolimode e o natalizumab são considerados drogas de segunda linha, usadas para resgatar pacientes com falha terapêutica (FARBER & SAND, 2015). A sociedade brasileira de neurologia tende a seguir o mesmo protocolo.

Os tratamentos acima citados são focados em modular ou diminuir a migração de células inflamatórias, principalmente as células T autorreativas, para o SNC e reduzir a resposta inflamatória (Quadro 3) (KIESEIER, 2014).

Quadro 3. Terapias modificadoras da doença e seus mecanismos de ação.

Agentes	Mecanismo de ação
Interferon-beta (IFN- β)	Induz fenótipos T reguladores (AXTELL <i>et al.</i> , 2013)
Polissacarídeo acetato glatiramer	Inibe os fenótipos Th1 e Th17 (AHARONI, 2014)
Anticorpo monoclonal natalizumabe	Impede a entrada da célula no SNC (LYCKE, 2015; KORNEK, 2015).
Moduladores do receptor da esfingosina 1-fosfato	Bloqueia o receptor da célula autoreativa, impedindo que a célula saia do gânglio (CHUN & HARTUNG, 2010)
Teriflunomida	Imunossupressor potente (OH & O'CONNOR, 2014)

Esses agentes possuem mecanismos diferentes, porém têm a mesma finalidade de prevenir a migração de células T autorreativas para o SNC e controlar a resposta imune, que se apresenta desregulada (KIESEIER, 2014). Contudo, deve-

se ressaltar que os efeitos colaterais para alguns desses fármacos podem ser graves ou até mesmo letais.

O uso de INF- β 1a e 1b tem beneficiado um número significativo de pacientes com EM-RR. Quando comparado com o grupo placebo, os IFNs reduzem em, aproximadamente, 30% a ocorrência de surtos, mas com baixa eficácia em prevenir a progressão da incapacidade neurológica (ASSOCIATION OF BRITISH NEUROLOGISTS, 2007). Estudos experimentais em pacientes com boa resposta terapêutica aos IFNs têm demonstrado que esses agentes inibem a produção de IL-1 β e IL-23 por DCs e de IL-17, IL-21, IL-22 e IFN- γ por linfócitos T CD4⁺ (ZHANG & MARKOVIC-PLESE, 2010; RAMGOLAM & MARKOVIC-PLESE, 2010; AXTELL *et al.*, 2013).

Como citado anteriormente, algumas opções terapêuticas envolvem o uso de anticorpos monoclonais, tais como o natalizumabe e o alentuzumabe. O natalizumabe é um anticorpo monoclonal anti-VLA-4 (integrina α 4 β 1) de segunda linha no tratamento da EM-RR. Como o natalizumabe bloqueia a interação entre o VLA-4, expresso na superfície dos linfócitos T, com o seu ligante endógeno, o VCAM-1, presente na superfície das células endoteliais, esse monoclonal inibe a migração dos linfócitos T periféricos para dentro do SNC (KORNEK, 2015; LYCKE, 2015).

Entre as estratégias mais promissoras na medicina regenerativa está o transplante de células hematopoiéticas (HSCT - *hematopoietic stem cell transplantation*), uma terapia excelente, mas ao mesmo tempo controversa para limitar a patologia deletéria do ataque imune (VAN WIJMEERSCH *et al.*, 2008). Esse transplante pode ser útil para melhorar a função neurológica de pacientes com EM, uma vez que substitui células autorreativas por células saudáveis (BURT *et al.*, 1995; WOGNUM *et al.*, 2003; VAN WIJMEERSCH *et al.*, 2008). Estudos têm mostrado que essa terapia impediu a ocorrência de novos surtos e o desenvolvimento de novas lesões num período de 5 a 7 anos (FASSAS *et al.*, 1997; FILIP *et al.*, 2009; ATKINS *et al.*, 2016).

Outra opção terapêutica envolve o uso de drogas citotóxicas amplamente empregadas no tratamento de neoplasias – o metotrexato, azatioprina, mitoxantrona

e ciclofosfamida. Por interferir com o ciclo celular, esses fármacos são potentes imunossupressores tanto da imunidade celular quanto humoral.

Apesar das opções terapêuticas, muitos pacientes falham no tratamento e isso deve estar atrelado ao nosso pobre conhecimento acerca dos diferentes fatores endógenos envolvidos na patologia, tais como neurotransmissores produzidos no local da lesão – o parênquima cerebral

1.4 – Serotonina

A 5-hidroxitriptamina (5-HT), conhecida como serotonina, é uma indolamina neurotransmissora característica do SNC (figura 4), onde desempenha um papel importante na regulação do humor, apetite, sono, temperatura corporal e metabolismo (KATO, 2013; SNIR, 2013). Também é encontrada no trato gastrointestinal (TGI) e em neurônios entéricos, onde medeia o controle de funções fisiológicas, como contração, relaxamento do músculo liso e secreção de cloreto, e os reflexos peristálticos em resposta a mudanças no conteúdo e pressão intestinais, de forma direta ou indireta, através de neurônios aferentes primários intrínsecos (KATO, 2013; KHAN & GHIA, 2010; SPILLER & LAM, 2012; EL-SALHY *et al.*, 2012).

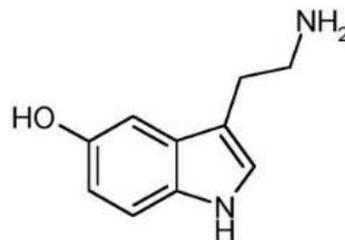


Figura 4. Estrutura química da Serotonina.

A serotonina é sintetizada nos neurônios serotonérgicos do SNC, porém sua maior produção (aproximadamente 95%) ocorre nas células enterocromafínicas (CE) do TGI e sua síntese ocorre de forma independente no tecido periférico e nervoso (KHAN & CHIA, 2010).

A serotonina tem como precursor o L-triptofano, que é um aminoácido essencial encontrado em proteínas de origem animal ou vegetal (KHAN & CHIA, 2010). Esse aminoácido é hidroxilado à serotonina pela ação da enzima triptofano hidroxilase (TPH – *tryptophan hydroxylase*) (figura 5) (KATO, 2013). Essa enzima é

de extrema importância, pois limita a velocidade de síntese da serotonina. Existem duas isoformas da TPH: a TPH1 e a TPH2. O TPH1 é encontrado nos órgãos periféricos, como o intestino e o baço, já a TPH2, no tronco cerebral (KHAN & CHIA, 2010).

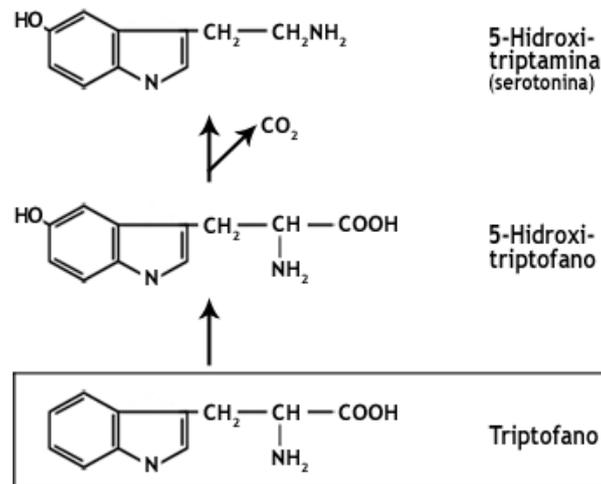


Figura 5. Via de síntese da Serotonina

A serotonina é uma molécula polar, portanto não passa facilmente pelas membranas biológicas, sendo necessário um transportador conhecido como SERT (do inglês *Serotonin Transporter*), permitindo sua entrada e saída das células (SPILLER & LAM, 2012). O SERT regula a magnitude e duração da resposta serotoninérgica, via reciclagem de serotonina lançada na fenda sináptica (KIM, 2012).

Quando liberada, a serotonina é capturada pelas células-alvo SERT⁺ onde fica armazenada dentro de vesículas (LAMP-1 – do inglês *Lysosomal-associated membrane protein 1*); posteriormente é liberada via exocitose Ca⁺⁺-dependente (O'CONNEL *et al.*, 2006) e, uma vez não utilizada, é degradada pela enzima monoamina oxidase A a ácido 5-hidroxi-indol-acético (5-HIAA) (KHAN & CHIA, 2010).

Os receptores que medeiam a ação da serotonina estão classificados em grupos conhecidos como 5-HT1 a 5-HT7, sendo que todos os receptores são receptores de membrana acoplados à proteína G, exceto o 5-HT3, que é um canal iônico (KATO, 2013). Tanto os receptores de serotonina quanto o seu transportador

estão amplamente distribuídos por todo o SNC e periférico, estando envolvidos em processos somestésicos (emoção, cognição, memória, percepção da dor e funções gastrointestinais) e nos processos imunes, desempenhando papel na regulação da inflamação (BENTON *et al.*, 2010; EL-SALHY *et al.*, 2012; KIM, 2012).

1.4.1 – Serotonina: papel imunomodulador

A serotonina atua tanto no SNC quanto no sistema nervoso periférico (SNP) (KIM, 2012), onde há uma interação complexa com o sistema imune, particularmente em nível do TGI. Estima-se que mais de 90% de todas as células do sistema imune estejam dispersas pelas mucosas, principalmente no TGI (KHAN & GHIA, 2010). Devido à localização estratégica, o sistema imune é capaz, portanto, de interagir com as células enterocromafínicas e conseqüentemente influenciar a síntese de serotonina (LI *et al.*, 2011). Como exemplo, citocinas produzidas pelas células T CD4⁺ (em especial pelos fenótipos Th1 ou Th2), ao interagirem com essas células, amplificam a produção de serotonina (KHAN & GHIA, 2010).

Adicionalmente, várias células da linhagem hematopoiética são fontes de serotonina, uma vez que armazenam e liberam 5-HT quando estimuladas. Plaquetas, monócitos, linfócitos, DCs e macrófagos são células que possuem o SERT e assim podem capturar serotonina do meio externo, armazenando-a em vesículas para posterior liberação via exocitose ao sofrer injúria ou em resposta a sinais inflamatórios (O'CONNELL *et al.*, 2006; SNIR *et al.*, 2013).

A sinalização da serotonina na célula-alvo pode desencadear respostas distintas (ANDERSON, 2013), dependendo do subtipo de receptor engajado, assim como do status de ativação prévio da célula-alvo. Os receptores de serotonina estão amplamente distribuídos pelos sistemas imune e nervoso. Sabe-se que os receptores 5-HT₃ e 5-HT₂ são expressos em monócitos, células T e DCs (KHAN & GHIA, 2010; KATO, 2013; SNIR *et al.*, 2013), enquanto os receptores 5-HT₄ e 5-HT₇ são expressos nas DCs (LI *et al.*, 2011).

Dependendo do subtipo de receptor, a 5-HT pode exercer efeitos antagônicos no sistema imune. A serotonina, provavelmente por agir através do receptor 5-HT_{1A}, ativa as células imunes induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (KHAN & GHIA, 2010). Em nível de células T, a 5-HT, via receptor 5-HT_{1A}, amplifica a

ativação e proliferação induzida via TCR/CD28 (BRANCO-DE-ALMEIDA *et al.*, 2011; KIM, 2012). Um provável mecanismo pelo qual a 5-HT executa essa função seria através da sua capacidade em reduzir níveis de AMPc na célula T (O'CONNELL *et al.*, 2006).

Estudo por Stejuli e colaboradores (2000) mostraram que os RNA mensageiros dos receptores 5-HT1B, 5-HT1F, 5-HT2A, 5-HT2B, 5-HT6 e 5-HT7 estão expressos *ex vivo* em linfócitos isolados do sangue periférico, timo e baço. Essas células quando estimuladas com mitógeno expressam o RNA mensageiro para o subtipo de receptor 5-HT3. Os RNAs mensageiros dos receptores 5-HT1A, 5-HT1D, 5-HT2C, 5-HT4, 5-HT5A e 5-HT5B não foram detectados na população de linfócitos (STEFULJ *et al.*, 2000).

A expressão de 5-HTR2A em células mononucleares do sangue periférico parece estar ligada à regulação da secreção de TNF- α e IL-1 β (CLOEZ-TAYARANI *et al.*, 2003). Foi reportado que linfócitos T, assim como células B e monócitos, expressam 5-HTR3 (RINALDI *et al.*, 2010). Esse receptor, quando interage com um antagonista, interrompe a produção de TNF- α e IL-1 β , sugerindo que esses receptores podem ativar a via p38/MAPK (FIEBICH *et al.*, 2004; MULLER *et al.*, 2004).

A interação da serotonina com os receptores expressos nas DCs induz a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas. Por exemplo, a liberação de IL-1 β e IL-8 pelas DCs estimuladas pelo LPS foi otimizada após a adição de 5-HT. Ademais, ao secretar serotonina, as DCs induzem a ativação do NF- κ B nos linfócitos T, reduzindo o limiar de ativação da resposta imune adquirida (LI *et al.*, 2011).

A maturação das DCs, que é dependente da exposição a estímulos microbianos e interações físicas com células T, regula a expressão do SERT e de IDO (Indoleamina 2,3-dioxygenase) – enzima limitante na via de degradação do triptofano (FANG *et al.*, 2012). Nesse contexto, a interação do CD40, expresso nas DCs, com seu ligante (CD40L) na célula T é capaz de suprimir a enzima IDO e estimular a expressão do SERT (O'CONNELL *et al.*, 2006). Coletivamente esses achados sugerem um efeito imunoestimulante da 5-HT na resposta imune.

Entretanto, várias outras evidências apontam na direção oposta quanto aos efeitos da serotonina no sistema imune.

Os Inibidores Seletivos de Recaptação da Serotonina (SSRIs – *Selective Serotonin Reuptake Inhibitors*), como, por exemplo, fluoxetina, sertralina, paroxetina, e citalopram, têm sido utilizados como antidepressivos (BRANCO-DE-ALMEIDA *et al.*, 2011; KIM, 2012; GOBIN *et al.*, 2013), pois, ao bloquearem o SERT, provocam um aumento da concentração de serotonina na fenda sináptica (BRANCO-DE-ALMEIDA *et al.*, 2011). Estudos têm sugerido que o uso dessas drogas e de antidepressivos tetracíclicos (domipramina e imipramina, por exemplo) inibe a proliferação e a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6 e IL-1 β) pelas células T (SPILLER & LAM, 2012; GOBIN *et al.*, 2013). Outros estudos demonstram efeito imunossupressor dessas drogas antidepressivas, através da estimulação da produção de IL-10 (KUBERA *et al.*, 2012).

Adicionalmente, essas drogas podem induzir a apoptose de células T ativadas através da ativação da via de sinalização MAPK associada a regulação negativa do fator anti-apoptótico bcl-2 (GOBIN *et al.*, 2013). Em outro trabalho, os SSRIs suprimiram a função de apresentadora de antígenos das DCs, inibindo a expressão de moléculas coestimulatórias, como ICOS, uma adesina que é requerida para resposta Th1 e Th2 (BRANCO-DE-ALMEIDA *et al.*, 2011).

Esses resultados, aparentemente discordantes, podem, na verdade, representar diferentes mecanismos de imunorregulação da 5-HT dependendo do sistema biológico estudado e do subtipo de receptor engajado pela serotonina.

2. OBJETIVOS

2.1 – Geral:

- Avaliar a capacidade da serotonina (5-HT) em modular o perfil fenotípico e funcional das células de T de pacientes com esclerose múltipla com a forma remitente-recorrente (EM-RR) na fase de remissão clínica.

2.1.1 – Específicos:

- Avaliar o impacto da 5-HT na resposta proliferativa de células T totais ativadas policlonalmente em cultura de células mononucleares do sangue periférico (CMSP);
- Dosar citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatória nos sobrenadantes das culturas de CMSP em resposta ao ativador policlonal de células T totais na presença ou na ausência de 5-HT;
- Determinar os efeitos da 5-HT na produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatória nos sobrenadantes das culturas de células T CD4⁺ e T CD8⁺ purificadas;
- Avaliar a influência da 5-HT em modular marcadores de função e ativação de células TCD4⁺ regulatórias;
- Avaliar o papel da serotonina em modular a frequência de diferentes fenótipos efetores de células TCD4⁺.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Grupos estudados:

Para o presente estudo, 27 pacientes com diagnóstico de esclerose múltipla na forma remitente-recorrente (EM-RR), na fase de remissão clínica, foram recrutados do ambulatório de Neurologia do Hospital Universitário Gafreé e Guinle (HUGG) e do Hospital da Lagoa (RJ) em parceria com as neurologistas Dr^a Cláudia Cristina Vasconcelos e Dr^a Regina Maria Papais Alvarenga. Os pacientes recrutados não estavam recebendo qualquer tratamento com drogas imunomoduladoras /imunossupressoras. Os prontuários foram analisados para coletar informações quanto à idade, gênero e tempo de doença (Tabela 1). Como grupo controle, 29 indivíduos saudáveis pareados por sexo e idade foram incluídos em nosso estudo.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da UNIRIO (Anexo) e as amostras de sangue periférico só foram colhidas após cada voluntário ter assinado o termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice).

3.2 – Coleta e purificação de células

Aproximadamente 20 mL de sangue periférico de cada indivíduo recrutado foram colhidos utilizando agulhas e seringas heparinizadas ou tubos estéreis contendo heparina (BD Vacutainer, Franklin Lakes, NY). Após a coleta, o sangue foi encaminhado para o laboratório de Imunofisiologia e Imunopatologia dos Linfócitos T (LLLIT/UNIRIO). A partir do sangue total, foram obtidos os plasmas e as células mononucleares do sangue periférico (CMSP), através da centrifugação a 2000 rpm durante 20 minutos, em gradiente de densidade Ficoll-Hypaque. As CMSP colhidas foram lavadas 2 vezes com solução de HANK e depois submetidas à determinação

da viabilidade celular através da contagem de uma alíquota em azul de trypan, utilizando câmara de Neubauer. A concentração de CMSP viáveis utilizada para os experimentos funcionais foi de 1×10^6 células/mL. Em alguns experimentos, células T CD4⁺ e T CD8⁺ dos pacientes com EM foram purificadas a partir da suspensão de CMSP totais utilizando colunas de separação e esferas imunomagnéticas para seleção negativa seguindo as instruções do protocolo fornecido pelo fabricante (StemCell Technologies™). Brevemente, as CMSP foram inicialmente incubadas com um coquetel de anticorpos capazes de reconhecer linfócitos B (CD19), monócitos (CD14), células NK (CD56) e as células T CD8⁺, para obter os linfócitos T CD4⁺ ou com um coquetel de anticorpos anti-CD19, anti-CD14, anti-CD56 e anti-CD4 (Miltenyi Biotec), para obter os linfócitos T CD8⁺. Em seguida, as células foram incubadas com esferas magnéticas e separadas por uma coluna de magneto. No final do processo, as células não aderidas à parede dos tubos foram coletadas, lavadas, contadas em azul de trypan e cultivadas sob diferentes condições. A purificação de células T CD4⁺ e T CD8⁺ foi maior que 97%, mensurada pela citometria de fluxo.

3.3 – Cultura de células mononucleares do sangue periférico e estímulos

As CMSP foram cultivadas em placas de 96 poços de fundo chato em 0,2 mL de meio RPMI 1640 completo. O meio RPMI 1640 é considerado completo quando se adiciona 2mM de L-glutamina (GIBCO, Carlsbad, CA, USA), 10% de soro fetal bovino, 20 U/ml de penicilina, 20 µg/ml de estreptomicina e 20 mM de tampão HEPES. Para induzir a ativação policlonal das células T, algumas culturas de CMSP (1×10^6 /mL) foram cultivadas com fitohemaglutinina (PHA, 1µg/mL) ou com o ativador policlonal anti-CD3/anti-CD28 (4 µL para cada 8×10^4 de células T) por 3 dias. Culturas de células T CD4⁺ ou T CD8⁺ purificadas (1×10^6 /mL) foram estimuladas com o ativador policlonal anti-CD3/anti-CD28 (4 µL para cada 8×10^4 de células T) por 3 dias. O efeito da serotonina em nossos ensaios foi avaliado seguindo a adição de 200 ng/mL de 5-HT no início do tempo de cultura. Vale ressaltar que a dose da 5-HT utilizada foi baseada em estudo prévio por Soga e colaboradores (2007) sobre o efeito de doses fisiológicas da 5-HT, no SNC, na função imune. Para os ensaios de dosagem de citocina, os sobrenadantes das

culturas foram colhidos e congelados. Para analisar a frequência das células T, através da citometria de fluxo, culturas de CMSP ($1 \times 10^6/\text{mL}$), após 3 dias, foram adicionalmente ativadas por 4 h com phorbol-12-miristato-13-acetato [PMA (20 ng/mL)] e ionomicina [IO (600 ng/mL)] na presença de brefeldina A (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Algumas culturas de células não receberam nenhum estímulo (controle negativo). Todas as culturas de células foram mantidas em atmosfera úmida a 37 °C e a 5% de CO_2 .

3.4 – Ensaio de proliferação celular

Culturas de CMSP ($1 \times 10^6/\text{mL}$) foram mantidas estimuladas por 3 dias com PHA (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) na ausência ou na presença de 5-HT (200ng/mL). O nível de proliferação das células T foi determinado pelo método da incorporação do nucleotídeo de timidina tritiada ($[^3\text{H}] \text{TdR}$, 4 $\mu\text{Ci}/\text{poço}$) adicionado às culturas 8 horas antes do término da incubação de 3 dias. As células foram recolhidas utilizando um coletor automático e a incorporação da timidina no DNA foi aferida utilizando líquido de cintilação. A leitura foi realizada num contador de partículas radioativas. Os resultados foram apresentados como média \pm desvio-padrão da contagem por minuto (cpm).

3.5 – Determinação de Citocinas

A quantificação de diferentes citocinas nos sobrenadantes das culturas de CMSP dos pacientes e do grupo controle foi realizada através da técnica de ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) usando os kits BD OptEIA seguindo as instruções do protocolo fornecido pelo fabricante (BD, Pharmigen, San Diego). Brevemente, 50 μL dos sobrenadantes (diluídos 1:10) foram adicionados a cada poço contendo anticorpo primário anti-citocina (anticorpo de captura). A placa foi incubada durante 2 horas e, após esse tempo, 100 μL do anticorpo secundário anti-citocina (previamente tratado com a enzima horseradish peroxidase conjugada a estreptavidina) foram adicionados em cada poço e incubados por 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, 100 μL de substrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) foram adicionados aos poços e a reação foi revelada 30 minutos depois, após a adição de uma solução de parada

[ácido fosfórico a ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$)]. As placas foram lidas a 450 nm em leitor de ELISA (DynexTechnologies, USA). Para o nosso estudo, foram dosadas as seguintes citocinas: IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-21, IL-22, IL-6 e IL-10. Citocinas humanas recombinantes variando de 4,5-500 pg/mL foram usadas para construir curvas-padrão.

3.6 – Análise da frequência de células T CD4⁺ por citometria de fluxo

Para determinação da frequência de diferentes subtipos de células T CD4⁺, culturas de CMSP foram estimuladas com anti-CD3/CD28 por 3 dias, na presença ou ausência de 5-HT, e rapidamente, por 4h, com PMA (20 ng/mL) e ionomicina (600 ng/mL) na presença de brefeldina A (10 $\mu\text{g/mL}$). Anticorpos monoclonais de camundongos dirigidos contra diferentes marcadores de células T humanas e marcados com diferentes fluorocromos (anti-CD4-FITC/PE-Cy5.5/APC, anti-FOXP3-PE, anti-CD25-APC, anti-CD39-APC, anti-CD152-APC, anti-IL-17-PECy7, anti-IL-10-AlexaFluor 488 ou anti-IFN- γ -APC) foram usados, em diferentes combinações, para analisar a frequência dos seguintes fenótipos de células T por citometria de fluxo: Th1 (CD4⁺IL-17⁻IFN- γ ⁺), Th17 (CD4⁺IL-17⁺IFN- γ ⁻), e células Tregs clássicas (CD4⁺CD152⁺CD25⁺FOXP3⁺IL-10⁺) e células Tr-1 (CD4⁺FOXP3⁺IL-10⁺). Todos os monoclonais e isótipos controles foram adquiridos na BioLenged (San Diego, CA, USA) e na BD Bioscience (San Diego, CA, USA). De forma resumida, CMSP (2×10^5 /tubo), cultivadas sob diferentes condições, foram inicialmente incubadas com as diferentes combinações dos anticorpos monoclonais dirigidos contra marcadores de superfície celular (anti-CD4, anti-CD25, anti-CD39) à temperatura ambiente e protegido da luz. Após 30 minutos, as células foram lavadas com solução de lavagem (PBS com 1% SFB) e depois incubadas com a solução de fixação/permeabilização (BD Pharmigen, San Diego, CA) a 4 °C e protegido da luz. Após 20 minutos, as células foram novamente lavadas e marcadas à 4 °C com anticorpos monoclonais dirigidos contra marcadores intracelulares (anti-IL-17, anti-CD152, anti-IFN- γ , anti-IL-10 e anti-FOXP3). Após 30 minutos, as células foram lavadas com solução de PBS a 1% de SFB e analisadas usando o citômetro Accuri

C6 (Accuri™, Ann Arbor, MI, USA). Após a aquisição de 50.000 a 100.000 eventos, os linfócitos foram confinados, com base no tamanho e complexidade, e analisados quanto a intensidade de fluorescência para cada cromógeno usando diferentes canais de detecção do aparelho. Os resultados foram analisados no software CFlow.

3.6 – Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa de gráfico GraphPad Prism versão 5.0 para Windows (GraphPad). Para determinar se duas variáveis, com distribuição não normal, eram estatisticamente diferentes para cada variável dada, foi utilizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. O teste t de Student foi aplicado para verificar se uma determinada variável, com distribuição normal, era estatisticamente diferente entre os indivíduos do mesmo grupo. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 – Impacto da serotonina na resposta proliferativa das células T de pacientes com EM-RR

Amostras de sangue periférico de pacientes com EM-RR, na fase de remissão clínica, (Tabela 1) foram coletadas para avaliar o impacto da serotonina (5-HT) em alguns eventos imunes mediados por células T. Como controle, os mesmos ensaios foram conduzidos em culturas contendo células T ativadas de indivíduos saudáveis. Como pode ser observada na tabela 1, os grupos foram pareados quanto ao gênero e idade.

Tabela 1. Características da população estudada.

Características	Controle ^a	EM-RR ^b
Nº indivíduos (n)	29	27
Mulher/Homem (n)	23/06	22/05
Idade em anos (media ± dp)	25,8 ± 6,9	33,6 ± 13,6
Duração da doença em anos (media ± dp)	NA ^d	4,7 ± 2,41
EDSS (mediana ± dp) ^c	NA	3,7 ± 2,4

^a Grupo controle (indivíduos saudáveis); ^b Pacientes com EM-RR na fase de remissão clínica; ^c EDSS, no momento do estudo; ^d Não aplicável; dp=desvio-padrão

O primeiro evento imune analisado no presente estudo foi a proliferação de células T através do método da incorporação de timidina tritiada (³H] TdR). Vale a

pena ressaltar que, em nenhum dos grupos estudados, a proliferação foi detectável nas culturas de células não estimuladas, isto é, mantidas apenas com meio de cultura com ou sem 5-HT (dados não mostrados). Como demonstrado na figura 6, as células T dos pacientes apresentaram uma clara tendência em proliferar menos em resposta ao PHA quando comparado ao grupo controle ($p=0,0679$). A adição de 5-HT a essas culturas reduziu a proliferação das células T tanto no grupo controle ($p=0,0004$) quanto no grupo dos pacientes com EM-RR ($p=0,0008$).

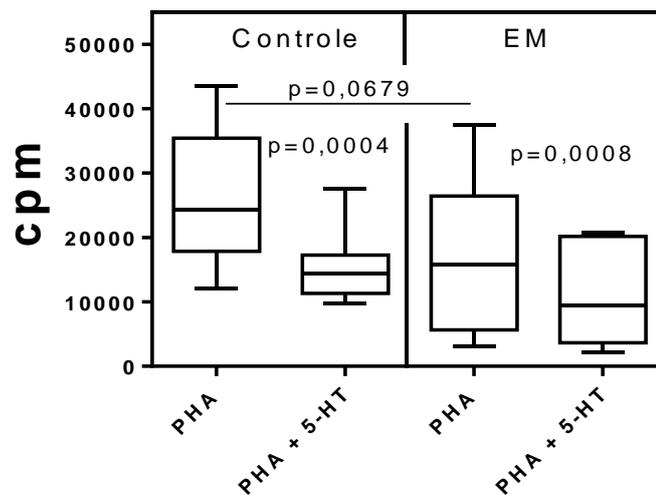


Figura 6. Efeito *in vitro* da serotonina (5-HT) na proliferação das células T de pacientes com EM-RR. As CMSP (1×10^6 /mL), purificadas de pacientes com EM-RR ($n=15$) e indivíduos saudáveis (controle, $n=20$), foram cultivadas por 3 dias na presença de PHA ($1\mu\text{g/ml}$) com ou sem 5-HT (200 ng/mL). O índice de proliferação foi avaliado através do nível de captura de timidina ($[^3\text{H}]$ TdR). Na figura, as linhas horizontais representam a mediana, os limites das caixas correspondem aos percentuais 25 e 75, e as linhas verticais indicam o intervalo. Os valores de p estão indicados na figura.

4.2 – Efeito da 5-HT na produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatória produzidas pelas células T de pacientes com EM-RR

O padrão de citocinas produzido pelos linfócitos T determina o tipo de resposta efetora executada por essas células. Logo o próximo passo foi avaliar o perfil de citocinas produzido pelas culturas de CMSP ativadas com PHA na ausência ou presença de 5-HT. Vale ressaltar que as culturas de células mantidas apenas na presença de meio de cultura, com ou sem 5-HT, não produziram níveis detectáveis de citocinas através da técnica utilizada, o ELISA (dados não mostrados).

O IFN- γ é uma citocina típica do fenótipo Th1 que é implicada na imunopatogênese da EM (LOVETT-RACKE *et al.*, 2011). Apesar de nenhuma diferença significativa na produção dessa citocina ter sido observada nos sobrenadantes das culturas de células de ambos grupos estudados (figura 7), a adição de 5-HT foi capaz de diminuir a produção do IFN- γ pelas culturas de células tanto no grupo controle ($p=0,0007$) como no grupo de pacientes com EM ($p<0,0001$).

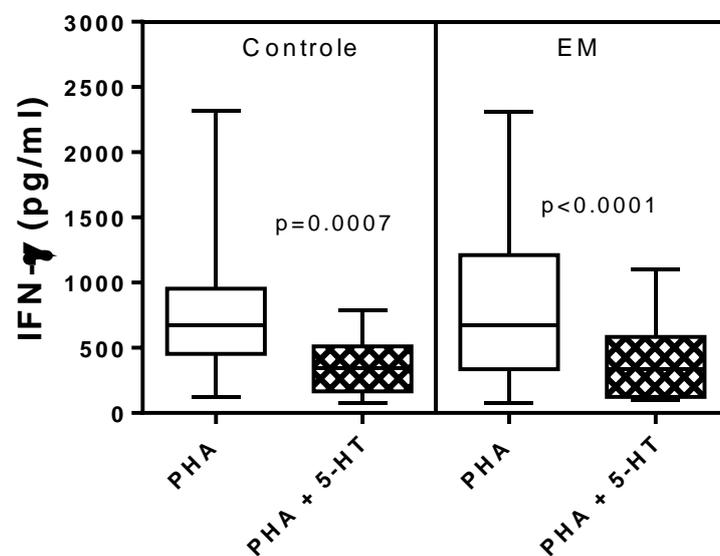


Figura 7. Efeito *in vitro* da serotonina (5-HT) na produção de IFN- γ pelas células T de pacientes com EM-RR. As CMSP (1×10^6 /mL), purificadas de pacientes com EM-RR ($n=15$) e indivíduos saudáveis (controle, $n=20$), foram cultivadas na presença de PHA ($1\mu\text{g/ml}$) com ou sem 5-HT (200 ng/mL) e os sobrenadantes foram recolhidos após 3 dias para quantificação da citocina IFN- γ através do método de ELISA. Na figura, as linhas horizontais dentro das caixas correspondem à mediana, os limites das caixas correspondem aos percentuais 25 e 75, e as linhas verticais indicam o intervalo. Os valores de p estão indicados na figura.

Quanto à produção de citocinas inflamatórias relacionadas ao fenótipo Th17 (figura 8), apenas a secreção de IL-22 e IL-17 foi superior nas culturas de células T ativadas obtidas dos pacientes, quando comparado ao controle (Fig.8C e E). A 5-HT reduziu, de forma significativa, a produção não apenas de IL-22, mas também do TNF- α e IL-6 pelas células T policlionalmente ativadas obtidas tanto do grupo controle quanto dos pacientes com EM (Fig. 8A e C). Com relação à produção de IL-21 e IL-17, a serotonina reduziu drasticamente a produção de ambas citocinas

apenas nas culturas de células contendo linfócitos T ativados dos pacientes com EM (Fig. 8D e E).

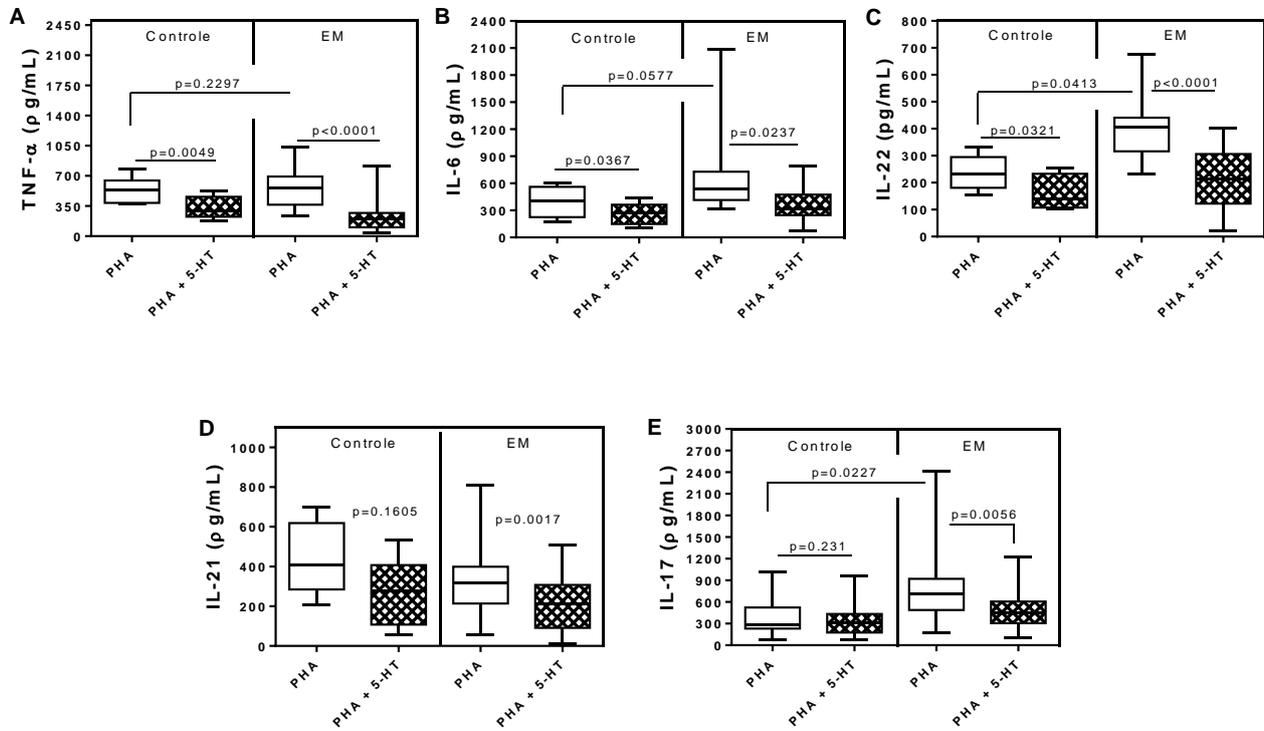


Figura 8. Impacto da 5-HT na produção de citocinas pró-inflamatórias relacionadas e específicas ao perfil Th17 nos pacientes com EM-RR. As CMSP, obtidas de indivíduos saudáveis (n=20) ou de pacientes com EM-RR (n=15), foram cultivadas com PHA (1µg/ml) na presença ou ausência de serotonina (200ng/mL) e os sobrenadantes foram recolhidos após 3 dias para quantificação de diferentes citocinas através do método de ELISA. A figura indica as dosagens de citocinas pró-inflamatórias relacionadas ao fenótipo Th17 [TNF-α, (A), IL-6, (B), IL-22, (C), IL-17, (D), e IL-21, (E)]. Na figura, as linhas horizontais dentro das caixas correspondem à mediana, os limites das caixas correspondem aos percentuais 25 e 75, e as linhas verticais indicam o intervalo. Os valores de p estão indicados na figura.

O desenvolvimento de doenças autoimunes tem sido associado a danos nos mecanismos imunes de autotolerância, tal como deficiência na produção de citocinas anti-inflamatórias pelas células T reguladoras (Tregs) (MICHEL *et al.*, 2008; VENKEN *et al.*, 2007 e 2008; FALCON, 2009; MA *et al.*, 2009; SMOLDERS *et al.*, 2009). Como demonstrado na figura 9, mesmo não tendo sido observada qualquer diferença na produção de IL-10 entre os grupos estudados, a 5-HT foi capaz de aumentar a liberação *in vitro* dessa citocina nas culturas de células do grupo controle e dos pacientes com EM.

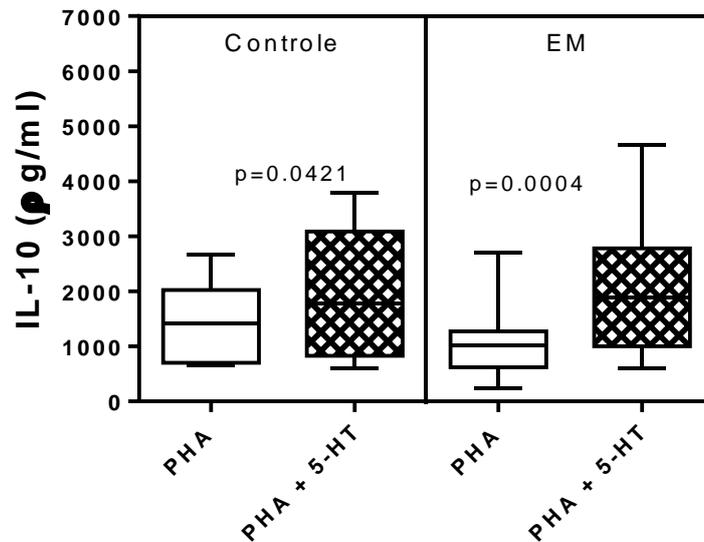


Figura 9. Impacto da serotonina (5-HT) na produção de IL-10 pelas CMSPs de pacientes com EM-RR. As CMSP, obtidas de indivíduos saudáveis (n=20) ou de pacientes com EM-RR (n=15), foram cultivadas com PHA (1µg/ml) na presença ou ausência de serotonina (200ng/mL) e os sobrenadantes foram recolhidos após 3 dias para quantificação de diferentes citocinas através do método de ELISA. A figura indica a dosagem da citocina anti-inflamatória IL-10 relacionada ao perfil Treg. Na figura, as linhas horizontais dentro das caixas correspondem à mediana, os limites das caixas correspondem aos percentuais 25 e 75, e as linhas verticais indicam o intervalo. Os valores de *p* estão indicados na figura.

4.3 – Efeito da 5-HT na produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatória produzidas pelas células TCD4⁺ e TCD8⁺ purificadas de pacientes com EM-RR

Resultados anteriores deste estudo demonstraram a capacidade da serotonina em modular a produção de diferentes citocinas nas culturas de CMSP sob estímulo do PHA. Com o objetivo de se avaliar a capacidade desse neurotransmissor em modular a produção de citocinas pelas células T CD4⁺ e T CD8⁺, amostras de sangue periférico dos pacientes com EM foram obtidas e esses linfócitos foram isolados através da seleção negativa usando colunas. Como demonstrado na figura 10, a 5-HT reduziu, de forma significativa, a produção das citocinas inflamatórias IFN- γ (p=0,0011), IL-17 (p=0,009), IL-6 (p<0,0001) e IL-22 (p=0,0107) produzidas pelas células T CD4⁺. Já no compartimento de células T

CD8⁺, a adição de 5-HT na cultura só não conseguiu reduzir a produção de IL-22, que foi a citocina produzida em menor quantidade quando comparada ao IFN- γ , à IL-17 e à IL6. Quanto à produção de IL-10, uma importante citocina anti-inflamatória (DIECKMANN *et al.*, 2001; LEE *et al.*, 2009), a 5-HT aumentou a produção dessa citocina apenas no compartimento de células T CD4⁺ ($p < 0,0001$).

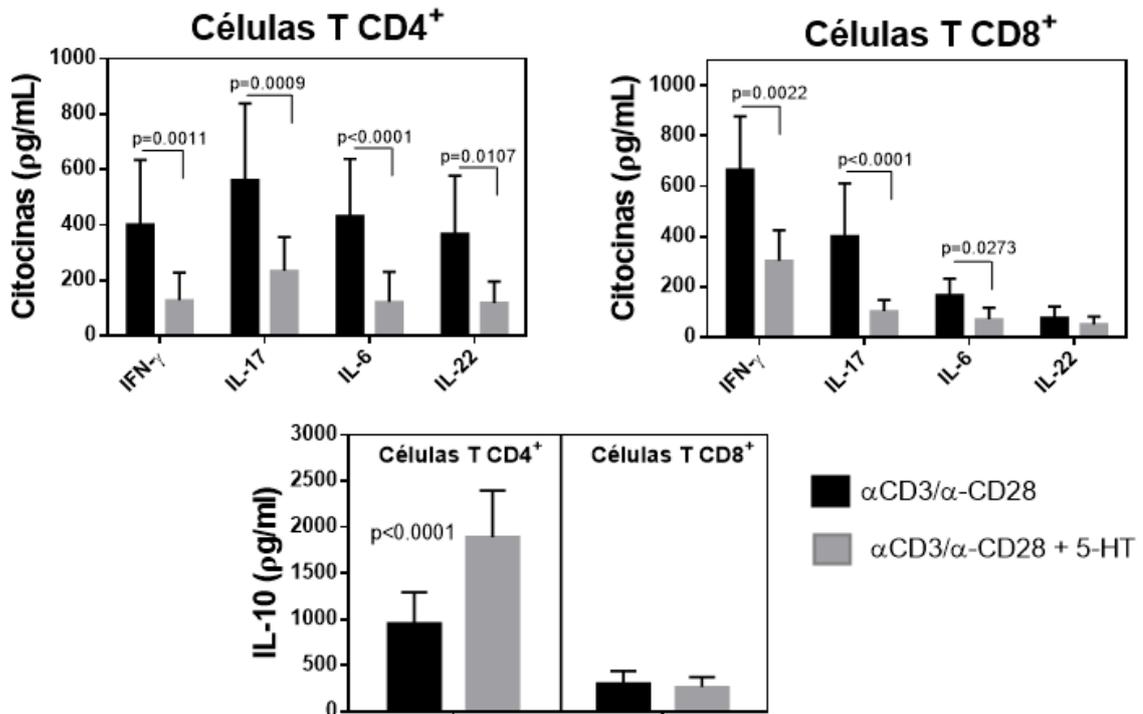


Figura 10. Capacidade da serotonina (5-HT) em modular a produção de citocinas pelas células T CD4⁺ e T CD8⁺ de pacientes com EM-RR. Células T CD4⁺ e T CD8⁺, obtidas de pacientes com EM-RR (n=15), foram estimuladas por 3 dias com esferas imunomagnéticas anti-CD3/anti-CD28 na presença ou na ausência de serotonina (5-HT, 200 ng/mL). As concentrações das citocinas foram determinadas através da técnica ELISA. Nos gráficos os valores de cada citocina estão representados como média \pm dp, e os valores de p estão indicados nas figuras.

4.4 – Papel da 5-HT em modular a frequência de diferentes subtipos de células T CD4⁺ produtoras de IL-10 de pacientes com EM-RR

Tendo visto que a produção de IL-10 foi aumentada com a adição da 5-HT apenas no compartimento TCD4⁺, e que essa citocina é muito importante na tolerância imune (PETERSON, 2012), nosso próximo objetivo foi realizar uma série de experimentos para identificar qual(is) o(s) subtipo(s) de células T CD4⁺ conhecidas em produzir IL-10 seriam modulados pela serotonina. Através da

citometria de fluxo, a adição de 5-HT elevou a frequência de células T CD4⁺ produtoras de IL-10 tanto no grupo de indivíduos saudáveis como no grupo de pacientes com EM (figura 11).

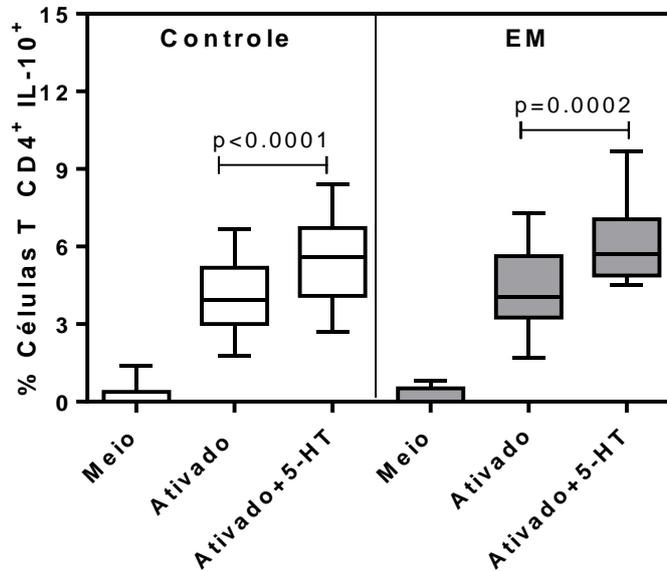


Figura 11. Impacto da serotonina (5-HT) em modular a frequência de células T CD4⁺ produtoras de IL-10. As CMSPs de indivíduos do grupo controle (n=9) e de pacientes com EM-RR (n=7) foram estimuladas por 3 dias com esferas revestidas de anticorpos anti-CD3/anti-CD28 (10 µL/mL), seguida de uma rápida ativação (4 h) com PMA (20 ng/mL) e ionomicina (600 ng/mL), na presença de brefeldina A (10 µg/mL). Em alguns poços, 200 ng/mL de 5-hidroxitriptinamida (5-HT) foram adicionadas. A frequência das células foi determinada por citometria de fluxo. A figura representa as frequências médias das células T CD4⁺ capazes de expressar IL-10. No gráfico, os valores de cada frequência estão representados como média ± dp, e os valores de *p* estão indicados nas figuras quando significativos (*p*<0,05).

Com base na expressão da proteína FOXP3, células T reguladoras capazes de produzir IL-10 podem ser identificadas como clássicas (FOXP3⁺) ou Tr-1 (FOXP3⁻). No presente estudo, a adição de 5-HT foi capaz de elevar a frequência de células TCD4⁺ IL-10⁺ Tregs clássicas e Tr-1 em ambos os grupos estudados (figura 12).

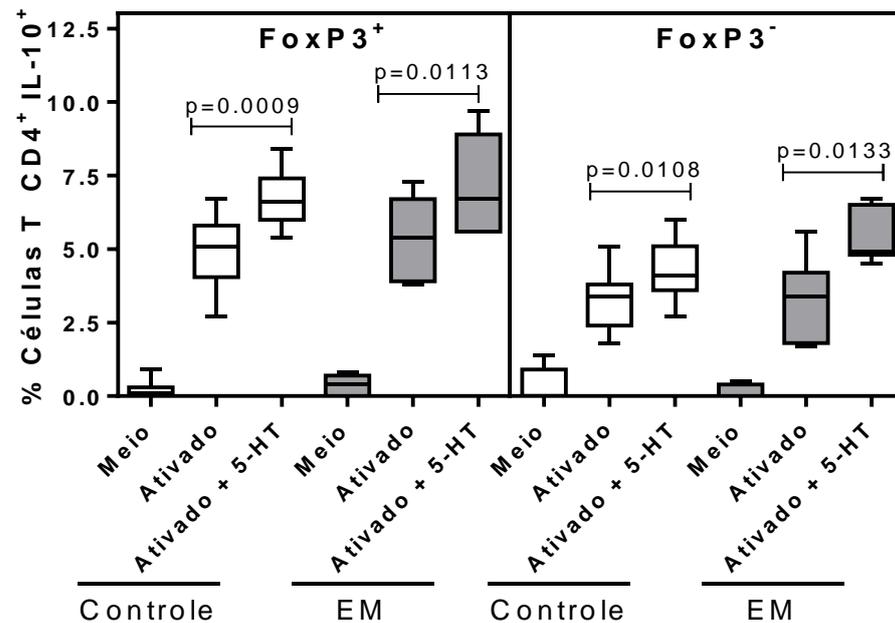


Figura 12. Impacto da serotonina (5-HT) em modular a frequência de células Tregs clássicas e Tr-1. As CMSPs foram inicialmente estimuladas por 3 dias com esferas revestidas de anticorpos anti-CD3/anti-CD28 (10 μ l/mL), seguida de uma rápida (4h) ativação com PMA (20 ng/mL) e ionomicina (600 ng/mL), na presença de brefeldina A (10 μ g/mL). Em alguns poços, 200 ng/mL de 5-hidroxitriptinamida (5-HT) foram adicionadas. A frequência das células foi determinada por citometria de fluxo, com prévia marcação. A figura representa as frequências médias das células T CD4⁺IL-10⁺ que expressam ou não FOXP3 no grupo controle e no grupo de pacientes com EM-RR. No gráfico, os valores de cada frequência estão representados como média \pm dp, e os valores de p estão indicados nas figuras quando significativos ($p < 0,05$).

Uma caracterização mais completa das células Tregs clássicas depende da co-expressão de outros marcadores, tais como CD25, CD152 e, principalmente, o CD39, que tem sido associado com a funcionalidade dessas células (BORSELLINO *et al.*, 2007). Nesse sentido, como pode ser observado na figura 13, a adição de 5-HT às culturas elevou, em ambos os grupos, a frequência de células T CD4⁺FOXP3⁺ que coexpressam CD39. Por outro lado, nenhuma diferença significativa foi observada na porcentagem dessas células capazes de coexpressar CD25 e CD152 seguido à adição de serotonina.

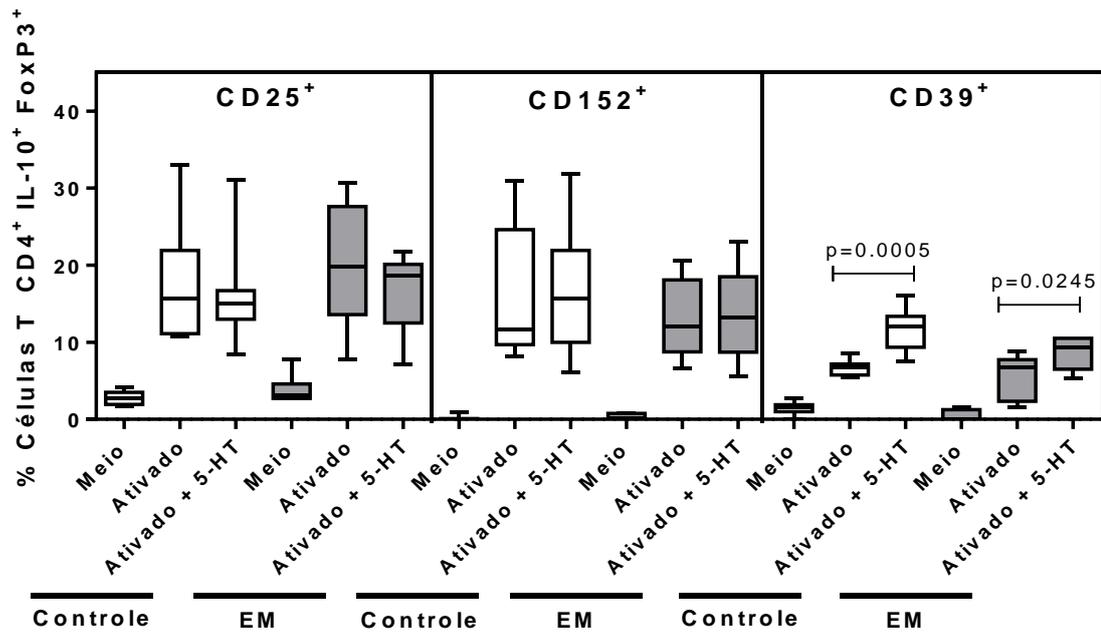


Figura 13. Impacto da serotonina (5-HT) em modular a coexpressão de marcadores de funcionalidade nas células TCD4⁺FOXP3⁺. As CMSPs foram inicialmente estimuladas por 3 dias com esferas revestidas de anticorpos anti-CD3/anti-CD28 (10 μ L/mL), seguida de uma rápida (4h) ativação com PMA (20 ng/mL) e ionomicina (600 ng/mL), na presença de brefeldina A (10 μ g/mL). Em alguns poços, 200 ng/mL de 5-hidroxitriptinamida (5-HT) foram adicionadas. **A** frequência das células foi determinada por citometria de fluxo. A figura representa as frequências médias do subtipo \pm dp das células T CD4⁺FOXP3⁺ que co-expressam CD25, CD152 ou CD39 no grupo controle e no grupo de pacientes com EM-RR. No gráfico, os valores de cada frequência estão representados como média \pm dp, e os valores de *p* estão indicados nas figuras quando significativos (*p*<0,05).

4.5 – Capacidade da 5-HT em modular a frequência de subtipos de células TCD4⁺.

Usando diferentes combinações de anticorpos, avaliamos a capacidade da 5-HT em modular a frequência de células TCD4⁺ pró-inflamatórias do tipo Th1 (IL-10⁻IFN- γ ⁺) ou Th17 (IL-10⁻IL-17⁺), ou ainda de Treg não convencionais, particularmente o subtipo Treg17 e TregIFN- γ ⁺ (capazes de expressarem simultaneamente IL-10 e IL-17 ou IFN- γ respectivamente). Como demonstrado na Figura 14.A, a 5-HT diminuiu a porcentagem das células dos tipos Th1 (IL-10⁻IFN- γ ⁺) e Th17 (IL-10⁻IL-17⁺) tanto no grupo controle como no grupo de pacientes, corroborando com os resultados anteriores. Apesar da serotonina ter reduzido a proporção das células T CD4⁺ IFN- γ ⁺ IL-10⁺ apenas no grupo de pacientes, esse neurotransmissor elevou a

percentagem de células Treg17, consideradas menos encefalitogênicas em ambos os grupos (Figura 14.B).

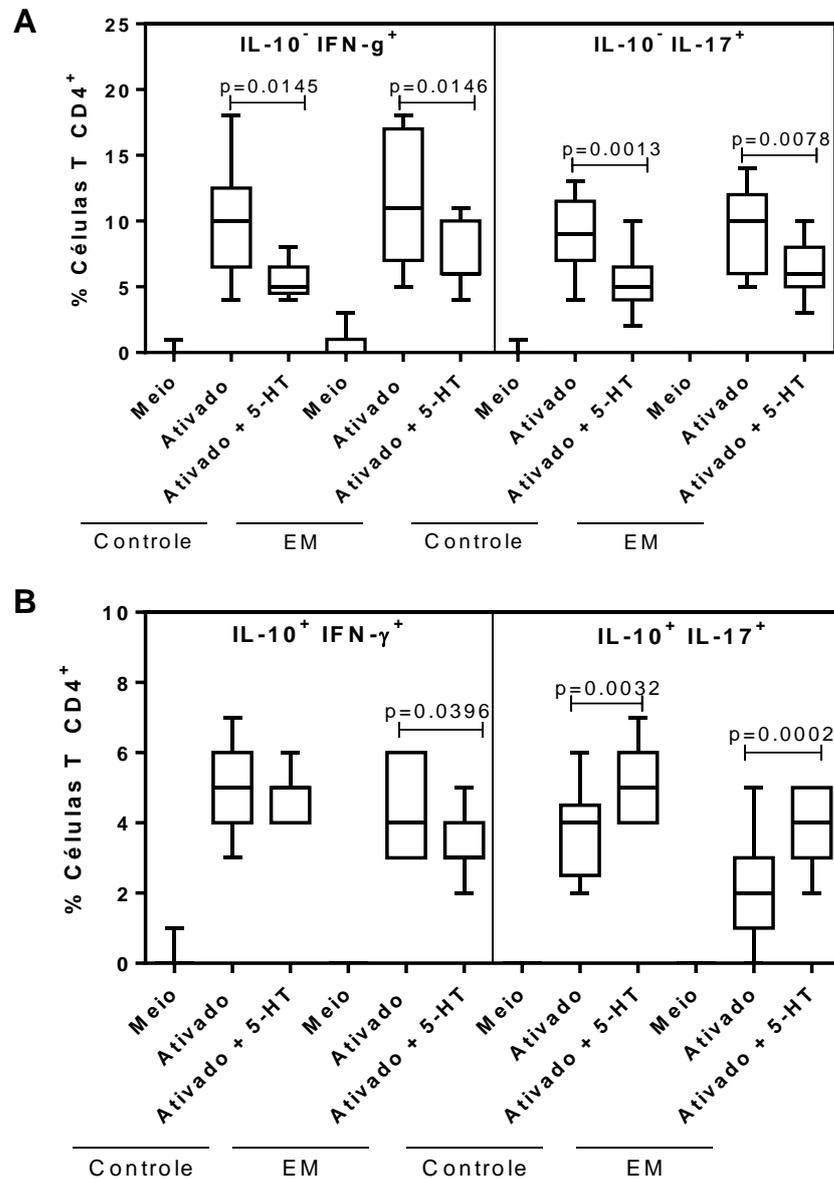


Figura 14. Capacidade da serotonina (5-HT) em modular a frequência de fenótipos de células T. As CMSPs foram inicialmente estimuladas por 3 dias com esferas revestidas de anticorpos anti-CD3/anti-CD28 (10 μ l/mL), seguida de uma rápida (4h) ativação com PMA (20 ng/mL) e ionomicina (600 ng/mL), na presença de brefeldina A (10 μ g/mL). Em alguns poços, 200 ng/mL de 5-hidroxitriptinamida (5-HT) foram adicionadas. **A** frequência das células foi determinada por citometria de fluxo. A figura representa as frequências médias das células T CD4⁺IL-10⁻IFN- γ ⁺ e T CD4⁺IL-10⁻IL-17⁺ [A], T CD4⁺IL-10⁺IFN- γ ⁺ e T CD4⁺IL-10⁺IL-17⁺ [B] no grupo controle e no grupo de pacientes com EM-RR. No gráfico, os valores

de cada frequência estão representados como média \pm dp, e os valores de p estão indicados nas figuras quando significativos ($p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

A Esclerose múltipla (EM) é uma doença que acomete o sistema nervoso central (SNC) causando a destruição da bainha de mielina (SUPPIEJ & CAINELLI, 2014; DECK *et al.*, 2013). Acredita-se que essa destruição seja mediada pelas células T, em especial pelo fenótipo Th17, que reconhece, como estranhos, os peptídeos oriundos de proteínas do oligodendrócito, que é a célula formadora da bainha de mielina no SNC.

Essa doença é causada por uma combinação de fatores genéticos e ambientais (SELM I *et al.*, 2012), entre eles, o estresse. O estresse tem sido relacionado com o aumento da produção de catecolaminas, como a dopamina (DA) (revisto por SABBAN & KVETŇANSKÝ, 2001), associado a uma redução nos níveis centrais de serotonina (5-HT). Levando em consideração que o SNC é o órgão afetado na EM, alterações nos níveis centrais dos neurotransmissores podem exercer efeitos adversos no curso da doença.

O estresse associado a síndrome neurocomportamental está ligado à depressão (KIM, 2012). Transtornos de humor têm sido amplamente implicados nas recaídas clínicas do paciente com EM com a forma remitente-recorrente (RR) (MOHR *et al.*, 2004; SCHUMANN *et al.*, 2012). Diante do exposto, resultados preliminares obtidos aqui sugerem que a redução de níveis de 5-HT possa estar ligada aos mecanismos moleculares relacionados aos efeitos deletérios do estresse no curso da EM. Até onde sabemos, esse é o primeiro estudo que realizou esse tipo de investigação.

De modo interessante, nos últimos anos, foi percebida uma redução na taxa de recaídas nos pacientes com EM associada ao tratamento da depressão com SSRIs (FOLEY *et al.*, 2014). Esses SSRIs inibem o transportador de membrana – o SERT – que promove a recaptção da serotonina. Com essa inibição, a concentração de 5-HT aumenta na fenda sináptica e no meio extracelular, possibilitando um maior tempo de ação desse neurotransmissor (BRANCO-DE-ALMEIDA *et al.*, 2011).

Sabendo que a EM tem sido considerada uma doença autoimune de mediação celular, nosso primeiro objetivo foi avaliar a influência que a 5-HT exerce

na resposta proliferativa das células T ativadas policlonalmente com o PHA, que é um poderoso mitógeno de células T humanas. Em nosso sistema, a linfoproliferação apresentou uma tendência a ser menor nas culturas de células de pacientes com EM, quando comparada ao grupo controle e isso pode estar ligado à menor viabilidade, como descrita por alguns autores (PELLEGRINO & KAYER 2000; TALER *et al.*, 2007) e/ou à maior suscetibilidade dessas células à morte celular induzida por ativação, fenômenos que pretendemos investigar no futuro. Nessas culturas, a adição de 5-HT diminuiu a proliferação dessas células tanto no grupo controle como no grupo de pacientes de EM. Esse resultado está de acordo com alguns estudos *in vitro* demonstrando efeito inibitório dos SSRIs na proliferação de linfócitos induzida por mitógeno (GOBIN *et al.*, 2013). Um dos mecanismos pelos quais os SSRIs reduzem a proliferação pode envolver a modulação negativa da expressão de moléculas co-estimuladoras. Nesse sentido, achados obtidos por Branco-de-almeida e colaboradores (2011) demonstraram que a fluoxetina, por reduzir a expressão do ICOS-L nas DCs, inibiu significativamente a proliferação de células T ICOS⁺ ativadas.

Além de inibir a expressão de ICOS-L nas DCs, acredita-se ainda que os SSRIs inibam as vias de ativação da proteína quinase C (PKC), assim como reduz o influxo de Ca⁺⁺ em diferentes células imunes (GOBIN *et al.*, 2013). Nesse estudo por Gobin e colaboradores, a inibição da proliferação de células T ativadas com outro mitógeno, a concanavalina A (ConA), pela fluoxetina, foi associada à degradação da PKC e à formação de AMPc. Por outro lado, a fluoxetina estimulou a resposta celular e elevou a translocação da PKC quando as concentrações de ConA foram reduzidas, sugerindo que os efeitos dos SSRIs nas célula-alvo possam ser dose-dependentes. Infelizmente, por limitações financeiras e operacionais, quanto aos custos dos insumos e a dificuldade de se obter número suficiente de células dos pacientes, nós não realizamos uma análise de diferentes doses da 5-HT nos eventos estudados aqui. No entanto, a dose de 5-HT usada em nosso estudo está dentro da faixa da normalidade, isto é, dos níveis de referência de 5-HT em indivíduos saudáveis (200 ng/mL).

Alguns estudos têm demonstrado, de maneira consistente, os efeitos imunoestimuladores dos antidepressivos. Por exemplo, Kubera e colaboradores (2012) mostraram que o tratamento com os SSRIs aumentou a atividade dos

linfócitos T, uma vez que, no estresse, o indivíduo fica mais suscetível às doenças infecciosas decorrentes de uma possível imunossupressão. Por outro lado, no contexto das doenças autoimunes, estudos em animais têm demonstrado que SSRIs podem atenuar a gravidade dos sintomas em desordens autoimunes provavelmente por modular negativamente a função das células T efectoras (TALER *et al.*, 2011; VOLLMAR *et al.*, 2009; YUAN *et al.*, 2012; KUBERA *et al.*, 2012). Esses resultados, aparentemente paradoxais podem ser explicados por diferentes fenômenos, tais como o subtipo majoritário de receptores para a 5-HT expressos sobre as células T.

Como mencionado na introdução desse trabalho, existem sete subtipos de receptores para a 5-HT (5-HTRs) e muitos dos efeitos antagônicos desse neurotransmissor podem estar atrelados à expressão diferenciada desses subtipos de receptores. Em nosso modelo de estudo, a produção crônica de citocinas inflamatórias pode modular a expressão diferencial desses 5-HTRs nas células imunes que migram para as áreas de lesão no SNC, onde os níveis de serotonina são superiores aos valores dosados no sangue periférico. Por exemplo, no modelo murino de colite induzida pelo sulfato de dextrano sódico (DSS – *dextran sulfate sodium*), a inibição do receptor 5-HT7 pelo seu antagonista (SB-269970) atenuou os sintomas intestinais. Análise histopatológica revelou que esse antagonista reduziu dramaticamente o grau de lesão no cólon, que foi diretamente associado a menor frequência de células imunes locais ativadas e, portanto, de citocinas inflamatórias (KATO, 2013). Nesse mesmo estudo, antagonistas do receptor 5-HT3 inibiram a produção das IL-1, IL-6 e TNF- α .

Estudo por Muller e colaboradores (2009) demonstrou que a serotonina foi capaz de aumentar a produção de IL-6 e IL-10 via receptores 5-HT4 e 5-HT7. Entretanto, Snir e colaboradores (2013) mostraram que a produção de TNF- α pelas CMSP após estimulação com LPS foi inibida via receptor 5-HT2A. Ademais, antidepressivos, como fluoxetina e desipramina, foram capazes de reduzir a produção de IL-6 e aumentar a liberação de IL-10 nos gânglios linfáticos de camundongos com hipersensibilidade de contato (CHS – *contact hypersensitivity*) induzida pela aplicação tópica do hapteno-2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) (CURZTEK *et al.*, 2013). Esses resultados revelam a complexidade das propriedades imunomoduladoras da 5-HT em decorrência da existência de

diferentes receptores que podem ser expressos em células imunes em diferentes *status* funcionais.

Finalmente, resultados divergentes quanto aos efeitos da 5-HT podem ainda ser explicados por possíveis variações genéticas no transportador de serotonina – o SERT – já que essas variações estão associadas a desordens psiquiátricas, como autismo (PRASAD *et al.*, 2009), ansiedade (LAUCH *et al.*, 2009), depressão e suicídio (SEGAL *et al.*, 2009), pois esse transportador tem um papel fundamental na recaptação da serotonina sináptica (ZHU *et al.*, 2010a). A determinação do padrão de expressão de receptores para serotonina em células T de indivíduos saudáveis e de pacientes com EM será, no futuro próximo, investigado pela nossa equipe.

A EM é uma doença crônica, inflamatória e desmielinizante, que causa diferentes distúrbios neurológicos. Acredita-se que falhas nos mecanismos de regulação imune associados à produção exacerbada de citocinas ligadas ao fenótipo Th17 estejam envolvidas no estabelecimento da doença (LOCK *et al.*, 2002; revisto por LOVETT-RACKE, YANG & RACKE, 2011). As células Th17, quando ativadas, produzem níveis elevados de IL-17 (IL-17A), IL-21, IL-22, IL-6 e TNF- α , exercendo efeitos deletérios na EM por induzir células locais (micróglia) e migrantes (monócitos/macrófagos e células dendríticas) a produzirem elevados níveis de radicais livres derivados do oxigênio, do nitrogênio e da metalo-proteínase 9, todos envolvidos no processo de desmielinização no SNC (revisto por LOVETT-RACKE, YANG, RACKE, 2011).

Em nosso estudo, a 5-HT reduziu a produção de citocinas relacionadas ao perfil Th17, como o TNF- α , IL-21, IL-22, IL-6 e IL-17. Apesar de não termos observado nenhuma diferença significativa na produção de IFN- γ entre os dois grupos estudados, a 5-HT foi também capaz de atenuar a produção de IFN- γ , importante citocina relacionada ao fenótipo Th1, que também tem sido atrelado aos processos de destruição da bainha de mielina em pacientes com EM (KEBIR *et al.*, 2009; BECHER, DURELL & NOELLE, 2002; GRAN *et al.*, 2002). Existe a possibilidade, no entanto, que, durante os surtos, os níveis de IFN- γ secretado pelas células T potencialmente encefalitogênicas atinjam níveis elevados. Infelizmente, dentro de nossa rotina, é muito difícil ter acesso às amostras desses pacientes desde que a equipe médica deve iniciar imediatamente o tratamento com elevadas

doses de corticoides, uma potente droga imunossupressora, impossibilitando uma análise desses fenômenos imunes durante as crises clínicas.

Estudos mostram que antidepressivos, dentre eles os SSRIs, são capazes de inibir a produção *in vitro* de citocinas pró-inflamatórias por linfócitos e monócitos humanos, de maneira dose-dependente (XIA *et al.*, 1996; MAES *et al.*, 1999; KUBERA *et al.*, 2001, 2009). Tsuchida e colaboradores (2011) reportaram que o uso de agonistas de 5-HT₄ (por exemplo, a tegaserode e cisaprida) diminuiu a produção de IFN- γ . Coletivamente, esses estudos sugerem um efeito modulador anti-inflamatório da serotonina, através de uma possível interação dos diversos sistemas do organismo na modulação da resposta inflamatória via receptores 5-HT, uma vez que esse antidepressivos atuam aumentando a concentração extracelular desse neurotransmissor, possibilitando assim um maior tempo de interação com os receptores na superfície de células diversas, como as do sistema imune.

Em nosso sistema, a adição da 5-HT às culturas foi capaz de aumentar a produção de IL-10 em ambos os grupos. Corroborando, vários estudos têm demonstrado que o tratamento com antidepressivos aumenta a produção de IL-10 (CURZTEK *et al.*, 2013; KUBERA *et al.*, 2012; BRANCO-DE-ALMEIDA *et al.*, 2011). Kubera e colaboradores (2012) mostraram que o uso de sertralina, um SSRI, aumenta a produção de IL-10 ao passo que diminui a produção de IFN- γ . Os antidepressivos, em especial os SSRIs, atenuam desordens inflamatórias ao aumentar a funcionalidade de células Tregs, que inibem o fluxo de células T efetoras no tecido inflamado, através da secreção de IL-10 (CURZTEK *et al.*, 2013). Foi mostrado por Kim e colaboradores (2012) que indivíduos com diagnóstico de depressão maior apresentam menor frequência de células TCD4 FOXP3⁺ no sangue. Ademais esses autores demonstram uma redução na expressão de 5-HT(1A)R na superfície dessas células Tregs. Esses resultados sugerem que a 5-HT seja capaz de aumentar a produção de IL-10, favorecendo o perfil de células Tregs, o que é benéfico no contexto das doenças autoimunes. Desta forma, os dados encontrados no presente estudo e na literatura podem ajudar a explicar a melhora clínica dos pacientes de EM-RR que fazem uso de SSRIs, que são uma possível nova abordagem terapêutica para pacientes com desordens inflamatórias, como a EM.

De forma interessante, e mais uma vez revelando a complexidade desse sistema biológico, um estudo realizado pelo nosso grupo mostrou que a DA favorece o fenótipo Th17 em indivíduos com transtorno de humor (FERREIRA *et al.*, 2011). A DA é a principal catecolamina produzida particularmente dentro do SNC, e um efeito imunomodulador semelhante da DA foi observado nas células T de pacientes com EM pelo nosso grupo (FERREIRA *et al.*, 2014). Nesse estudo, as células T desses indivíduos apresentaram um aumento na proliferação quando ativadas na presença de DA. Além disso, a adição desta catecolamina favoreceu o fenótipo Th17 ao elevar a produção *in vitro* de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6 e IL-17. Já a produção de IL-10 foi diminuída nas culturas de células T ativadas que receberam a DA, ao contrário do que foi observado com a adição da 5-HT nas culturas de células T do presente estudo. Esse efeito observado deve estar relacionado à interação desses neurotransmissores com seus diferentes receptores na superfície da célula T, que modula positiva ou negativamente essas células.

Dando continuidade ao nosso estudo, nosso próximo objetivo foi determinar se a 5-HT exerceria efeitos diferenciais no padrão de secreção de citocinas nas células T CD4⁺ e T CD8⁺ purificadas. Vale ressaltar que, por uma questão de custo dos insumos necessários para esse experimento, essa etapa do estudo foi conduzida apenas com amostras de sangue de pacientes com EM.

Com relação à produção de citocinas relacionadas ao perfil Th17, a 5-HT foi capaz de diminuir a produção de IL-17, IL-6 e IL-22 na cultura de células T CD4⁺ ativadas de pacientes. Enquanto que no compartimento das células T CD8⁺, a 5-HT não alterou, de forma significativa, a produção de IL-22, mas reduziu os níveis de IL-17, IL-6 secretados. Esses resultados sugerem que, *in vitro*, as células TCD4⁺ ou TCD8⁺ dos pacientes são sensíveis à modulação da 5-HT no que diz respeito à produção de citocinas pró-inflamatórias. Esse efeito imunossupressor torna-se benéfico para os pacientes uma vez que os surtos caracterizam-se por uma inflamação acentuada no parênquima cerebral, que destrõem a bainha de mielina dos neurônios, implicando na perda da transmissão do impulso nervoso e consequentes sequelas motoras e visuais, as mais comuns.

Deficiências nos mecanismos de auto-tolerância são atrelados à EM. Curiosamente, em nosso estudo, apesar da serotonina ter elevado a produção da IL-

10 em culturas de CMSP, observamos aqui que esse efeito foi restrito às células T CD4⁺ dos pacientes com EM. Um incremento na produção de IL-10 deve auxiliar no controle da síntese e secreção de citocinas pró-inflamatórias nas culturas de células Th1 e Th17, uma vez que estes fenótipos estão fortemente implicados na patogênese das lesões neuronais (POLANCZYK *et al.*, 2006; TAI *et al.*, 2008). A incapacidade da 5-HT em elevar a produção de IL-10 pelas células TCD8⁺ pode estar relacionada à baixa expressão de subtipos de receptores para serotonina na superfície desses linfócitos capazes de induzir diretamente a produção dessa citocina. Por outro lado, a habilidade desse neurotransmissor em diminuir a produção de citocinas pró-inflamatórias sugere que outros subtipos de 5-HTRs devem ser igualmente expressos nas células T CD4⁺ e TCD8⁺. Estudos que avaliem a expressão diferencial de receptores da 5-HT na superfície das células T em nosso estudo precisam ser conduzidos.

Além da IL-10, outros marcadores das células T regulatórias têm sido utilizadas para identificá-las: a expressão de FOXP3, CTLA-4 (CD152), CD25 e mais recentemente o CD39, sendo esse último indicativo de funcionalidade dessas células. A expressão do CD39 nas células T parece ser induzida através da sinalização via receptor aril hidrocarbono (BORSELLINO *et al.*, 2007; GANDHI *et al.*, 2010). Funcionalmente o CD39 degrada a molécula de adenosina trifosfato extracelular em adenosina monofosfato, considerada um dos mecanismos de ação pelos quais as Tregs reduzem a inflamação (BORSELLINO *et al.*, 2007).

No contexto da EM, deficiências funcionais das células T regulatórias CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ e das células Tr1 (IL-10⁺FOXP3⁻) têm sido descritas (VIGLIETA *et al.*, 2004; ASTIER *et al.*, 2006; HAAS *et al.*, 2014). A diferenciação de Tregs é carregada pelo fator de transcrição FOXP3, que é importante para a função supressiva (FONTENOT *et al.*, 2005; WILLIAMS *et al.*, 2007). Deficiência genética do FOXP3 induz disfunção de células Treg e desregulação imune (NIE *et al.*, 2015), podendo desencadear doenças autoimunes, como a EM.

De forma interessante, no presente estudo, a 5-HT aumentou, de forma significativa, a frequência das células TCD4⁺ FOXP3⁺ e FOXP3⁻ (Tr-1) capazes de produzir IL-10 nas culturas de células de pacientes com EM e de indivíduos saudáveis. Uma análise mais minuciosa dessas células revelou que a 5-HT elevou a

proporção do subtipo mais funcional, isto é, as células Tregs CD39⁺. Apesar de não termos realizado testes funcionais relacionados à capacidade das células Treg tratadas com 5-HT em inibir a proliferação das células T efetoras, a capacidade desse neurotransmissor em elevar a expressão de IL-10 e CD39 em células T CD4⁺ já sugere um aumento na função reguladora desse subtipo celular pela 5-HT. Coletivamente esses achados sugerem um efeito predominantemente anti-inflamatório da serotonina o que pode trazer benefícios para os pacientes com EM com a forma remittente- recorrente.

Estudo por Muls e colaboradores (2015) mostrou que a proporção de células Tregs foi similar nos pacientes durante as recaídas e no grupo controle, porém a frequência dessas células que expressavam CD39 foi mais alta no grupo de pacientes, provavelmente como uma tentativa de controlar o *status* inflamatório no qual o paciente se encontra. No presente estudo, por dificuldade de acesso ao paciente, não foi possível estudar o perfil fenotípico e funcional das células T de pacientes durante os surtos e sim, apenas em fase de remissão. Entretanto mostramos que a adição de 5-HT elevou a proporção dessas células Tregs CD39⁺ nos pacientes com EM em fase de remissão. Sendo assim, acreditamos que um incremento na produção desse neurotransmissor possa efetivamente ajudar os pacientes em surto.

Em acordo com os nossos dados de dosagem de citocinas obtidos pela técnica ELISA, a análise fenotípica, através da citometria de fluxo, confirmou a capacidade da 5-HT em inibir a percentagem de células T efetoras relacionadas aos fenótipos mais implicados na imunopatogênese da EM. Por outro lado, esse neurotransmissor foi capaz de induzir, *in vitro*, uma expansão do fenótipo Treg 17, um novo subtipo de células Th17 capaz de produzir IL-10 e controlar respostas inflamatórias, sendo menos patogênicas (MCGEACHY *et al.*, 2007; SHI *et al.*, 2010; PETER *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2015). Esses resultados, associados aos dados obtidos por ELISA, reforçam as propriedades imunomoduladoras da serotonina e sugerem o uso de manobras para elevar os níveis endógenos desse neurotransmissor no auxílio do manejo clínico de pacientes com EM e depressão, uma vez que a prevalência de depressão nesses pacientes é de 37 a 54% (HOANG *et al.*, 2016).

Por fim, Zhang e colaboradores (2016) não conseguiram mostrar uma correlação entre o tratamento com SSRIs com a progressão e a incapacidade acumulada em pacientes com EM. Diferentemente de Foley e colaboradores (2014) que mostraram a capacidade desses antidepressivos de provocar uma melhora clínica, ou seja, menor taxa de recaídas, nos pacientes que fizeram uso destes fármacos. Um fator que pode estar envolvido nas observações contraditórias é a fase da doença estudada. No estudo de Foley, os pacientes apresentavam a forma remittente-recorrente, enquanto Zhang estudou pacientes com a forma primária-progressiva e secundária-progressiva. Sabe-se que essas formas progressivas conduzem o paciente para a neurodegeneração e não respondem ao tratamento com as TMD.

Se os nossos resultados forem confirmados por outros grupos de pesquisa poder-se-á indicar a introdução da serotonina, através da administração de SSRIs por exemplo, como adjuvante no tratamento da EM, principalmente em pacientes depressivos que, pela patologia do transtorno de humor, possuem a concentração de serotonina diminuída.

6. CONCLUSÃO

- A capacidade da serotonina (5-HT) em diminuir a proliferação das células T de pacientes com esclerose múltipla (EM) com a forma remitente-recorrente e a produção de citocinas pró-inflamatórias tanto pelas células TCD4⁺ e TCD8⁺ revela seu grande potencial em inibir a inflamação no parênquima cerebral, podendo contribuir na redução de episódios agudos de comprometimento neurológico.
- A possibilidade de avaliar os diferentes fenótipos envolvidos na imunopatogênese da EM, através da citometria de fluxo, fortaleceu os resultados da diminuição da produção de citocinas no sobrenadante das culturas uma vez que, *in vitro*, a 5-HT diminuiu a frequência das células T efetoras relacionadas à EM – os fenótipos Th1/Tc-1 e Th17/Tc-17.
- A habilidade da 5-HT em favorecer a expansão de diferentes subtipos de células T CD4⁺ reguladoras clássicas revela outro mecanismo pelo qual esse neurotransmissor pode beneficiar o tratamento adjuvante dos pacientes com EM que sofrem de depressão.

Apesar de preliminares, os resultados aqui apresentados indicam que a serotonina exerce um efeito anti-inflamatório importante tanto diretamente, por inibir as células T efetoras, como indiretamente, por favorecer a expansão de células T CD4⁺ reguladoras. Esses achados podem ajudar a explicar, ao menos em parte, por que o tratamento com SSRIs podem atenuar a progressão da EM.

REFERÊNCIAS:

- ADAMS, R.D.; VICTOR, M. (1989). Multiple sclerosis and allied demyelinating diseases. **Principles of Neurology**, 4: 755-774;
- AHARONI R. (2014) Immunomodulation neuroprotection and remyelination - the fundamental therapeutic effects of glatiramer acetate: a critical review. **J Autoimmun.**, 54: 81-92;
- ALUVIHARE, V.R.; KALLIKOURDIS, M.; BETZ, A.G. (2004). Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. **Nat. Immunol.**, 5: 266–271;
- ALVES-LEON, S.V.; Malfetano, F.R.; PIMENTEL, M.L. ESTRADA, C.L.; PEREIRA, V.C.; LIEM, A.M.; NOVIS, S.A. (2008). Multiple sclerosis outcome and morbi-mortality of a Brazilian cohort of patients. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, São Paulo, 66: 671-677;
- ANDERSON, A.; LAURENSEN-SCHAFER, H.; PARTRIDGE, F.A.; HODGKIN, J.; MCMULLAN, R. (2013). Serotonergic Chemosensory Neurons Modify the *C. elegans* Immune Response by Regulating G-Protein Signaling in Epithelial Cells. **PLoS Pathog.**, 9(12): e1003787;
- ANDO D.G.; CLAYTON J.; KONO D.; URBAN, J.L.; SERCARZ, E.E. (1998). Encephalitogenic T cells in the B10.PL model of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) are of the Th-1 lymphokine subtype. **Cell. Immunol.**, 124: 132–143;
- ANNUNZIATO, F.; COSMI, L.; SANTARLASCI, V.; MAGGI, L.; LIOTTA, F.; MAZZINGHI, B.; PARENTE, E.; FILÌ, L.; FERRI, S.; FROSALI, F.; GIUDICI, F.; ROMAGNANI, P.; PARRONCHI, P.; TONELLI, F.; MAGGI, E.; ROMAGNANI, S. (2007). Phenotypic and functional features of human Th17 cells. **J. Exp. Med.**, 204: 1849-1861;
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ESCLEROSE MÚLTIPLA (ABEM). Disponível em: <www.abem.org.br>. Acesso em: 12 dez. 2014;

ASSOCIATION OF BRITISH NEUROLOGISTS. (2007). ABN guidelines for treatment of multiple sclerosis with β -interferons and glatiramer acetate. <http://www.theabn.org/downloads/ABN-MS-Guidelines-2007.pdf>;

ASTIER, A.L.; MEIFFREN, G.; FREEMAN, S.; HAFLER, D.A. (2006). Alterations in CD46- mediated Tr1 regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. **J Clin Invest.**, 116(12): 3252–3257;

ATKINS, H.; BOWMAN, M.; ALLAN, D.; et al. (2016). Immunoablation and autologous haemopoietic stem-cell transplantation for aggressive multiple sclerosis: a multicentre single-group phase 2 trial. **Lancet** 2016; published online June 9;

AXTELL, R.C.; RAMAN, C.; STEINMAN, L. (2013). Type I interferons: beneficial in Th1 and detrimental in Th17 autoimmunity. **Clin Rev Allergy Immunol.**, 44(2): 114-20;

AZIZI, G.; SIMHAG, A.; M-M-EL ROUBY, N.; MIRSHAFIEY, A. (2015). Th22 Cells Contribution in Immunopathogenesis of Rheumatic Diseases. **Iran J Allergy Asthma Immunol.**, 14(3): 246-54;

BECHER, B.; DURELL, B.G.; NOELLE, R.J. (2002). Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukin-12. **J. Clin. Invest.**, 110: 493–97;

BÉGIN, P.; SCHULZE, J.; BARON, U.; OLEK, S.; BAUER, R.N.; PASSERINI, L.; BACCHETA, R.; NADEAU, K.C. (2015). Human in vitro induced T regulatory cells and memory T cells share common demethylation of specific FOXP3 promoter region. **Clin Transl Allergy.**, 20(5): 35;

BENTON, T.; LYNCH, K.; DUBÉ, B.; GETTES, D.R.; TUSTIN, N.B.; LAI, J.P.; METZGER, D.S.; BLUME, J.; DOUGLAS, S.T.; EVANS, D.L. (2010). Selective Serotonin Reuptake Inhibitor Suppression of HIV Infectivity and Replication. **Psychosom Med.**, 72(9): 925-932;

BJARTMAR, C.; WUJEK, J.R.; TRAPP, B.D. (2003). Axonal loss in the pathology of MS: consequences for understanding the progressive phase of the disease. **J. Neurol. Sci.**, 206: 165–171;

- BONASIO, R.; VON ADRIAN, U.H. (2006). Generation, migration and function of circulating dendritic cells. **Cur. Opin. Immunol.**, 18: 503-511;
- BORSELLINO, G.; KLEINWIETFIELD, M.; DI MITRI, D.; STERNJAK, A., et al. (2007). Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. **Blood**, 110: 1225–1232;
- BRAGA, W.M.; DA SILVA, B.R.; DE CARVALHO, A.C.; MAEKAWA, Y.H.; BORTOLUZZO, A.B.; RIZZATTI, E.G.; ATANACKOVIC, D.; COLLEONI, G.W. (2014). FOXP3 and CTLA4 overexpression in multiple myeloma bone marrow as a sign of accumulation of CD4(+) Tregulatory cells. **Cancer Immunol Immunother.**, 63(11): 1189-97;
- BRANCO-DE-ALMEIDA, L.S.; KAJIYA, M.; CARDOSO, C.R.; SILVA, M.J.B.; OHTA, K.; ROSALEN, P.L.; FRANCO, G.C.N.; HAN, X.; TAUBMAN, M.A.; KAWAI, T. (2011). Selective serotonin reuptake inhibitors attenuate the antigen presentation from dendritic cells to effector T lymphocytes. **FEMS Immunol Med Microbiol.** 62(3): 283–294;
- BRUCKLACHER-WALDERT, V.; STURNER, K.; KOLSTER, M.; WOLTHAUSEN, J.; TOLOSA, E. (2009). Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. **Brain**, 132: 3329–3341;
- BURT, R.K.; BURNS, W.; HESS, A. (1995). Bone marrow transplantation for multiple sclerosis. **Bone Marrow Transplant.**, 16(1):1–6;
- CAO, W.; LIU, Y.J. (2007). Innate immune functions of plasmacytoid dendritic cells. **Cur Opin Immunol.**, 19: 24-30;
- CARBONE, F.R.; HEATH, W.R. (2003). The role of dendritic cell subsets in immunity to viruses. **Cur Opin Immunol.**, 15: 416-420;
- CERWENKA, A.; MORGAN, T.M.; HARMSSEN, A.G.; DUTTON, R.W. (1999). Migration kinetics and final destination of type 1 and type 2 CD8 effector cells predict protection against pulmonary virus infection. **J Exp Med.**, 189: 423-34;
- CHANG, S.Y.; SONG, J.H.; GULENG, B.; COTONER, C.A.; ARIHIRO, S.; ZHAO, Y.; CHIANG, H.S.; O'KEEFFE, M.; LIAO, G.; KARP, C.L.; KWEON, M.N.;

- SHARPE, A.H.; BHAN, A.; TERHORST, C.; REINECKER, H.C. (2013) Circulatory antigen processing by mucosal dendritic cells controls CD8⁽⁺⁾ T cell activation. **Immunity**, 38: 153–165;
- CHU, C.Q.; WITTMER, S.; DALTON, D.K. (2000). Failure to suppress the expansion of the activated CD4 T cell population in interferon gamma-deficient mice leads to exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis. **J. Exp. Med.**, 192: 123–128;
- CHUN, J.; HARTUNG, H.P. (2010). Mechanism of action of oral fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis. **Clin Neuropharmacol.**, [S.l.], 33(2): 91-101;
- CIRIC, B.; EL-BEHI, M.; CABRERA, R.; ZHANG, G.X.; ROSTAMI, A. (2009). IL-23 drives pathogenic IL-17-producing CD8+ T cells. **J Immunol.**, 182: 5296-305;
- CLOEZ-TAYARANI, I.; PETIT-BERTRON, A.F.; VENTERS, H.D.; CAVAILLON, J.M. (2003). Differential effect of serotonin on cytokine production in lipopolysaccharide-stimulated human peripheral blood mononuclear cells: involvement of 5-hydroxytryptamine 2A receptors. **Int. Immunol.**, 15: 233–240;
- COQUERELLE, C.; MOSER, M. (2010). DC subsets in positive and negative regulation of immunity. **Immunol Rev.**, 234(1): 317-334;
- CORES, E.V.; VANOTTI, S.; BURIN, D.I.; POLITIS, D.G.; VILLA, A. (2014). Factors associated to the work situation of patients with multiple sclerosis. **Rev Neurol.**, 16;58(4): 175-83;
- CORTEZ-ESPINOSA, N.; CORTÉS-GARCIA, J.D.; MARTÍNEZ-LEIJA, E.; RODRÍGUEZ-RIVERA, J.G.; BARAJAS-LÓPEZ, C.; GONZÁLEZ-AMARO, R.; PORTALES-PÉREZ, D.P. (2015). CD39 expression on Treg and Th17 cells is associated with metabolic factors in patients with type 2 diabetes. **Hum Immunol.** 76(9): 622-30;
- COSENTINO, M.; FIETTA, A. M.; FERRARI, M.; RASINI, E.; BOMBELLI, R.; CARCANO, E.; SAPORITI, F.; MELONI, F.; MARINO, F.; LECCHINI, S. (2007). Human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells selectively express tyrosine hydroxylase and contain endogenous catecholamines subserving an autocrine/paracrine loop. **Blood**, 109: 632-642;

- COSTANTINO, C.M.; BAECHEER-ALLAN, C.M.; HAFLER, D.A. (2008). Human regulatory T cells and autoimmunity. **Eur. J. Immunol.**, 38: 921-924;
- CRAWFORD, A.; JEWELL, S.; MARA, H.; MCCATTY, L.; PELFREY, R. (2014). Managing treatment fatigue in patients with multiple sclerosis on long-term therapy: the role of multiple sclerosis nurses. **Patient Preference and Adherence**, 2014(8): 1093–1099;
- CROZAT, K.; VIVIER, E.; DALOD, M. (2009). Crosstalk between components of the innate immune system: promoting anti-microbial defenses and avoiding immunopathologies. **Immunol. Rev.**, 227: 129–149;
- CUA, D.J.; SHERLOCK, J.; CHEN, Y.; MURPHY, C.A.; JOYCE, B.; SEYMOUR, B.; LUCIAN, L.; TO, W.; KWAN, S.; CHURAKOVA, T.; ZURAWSKI, S.; WIEKOWSKI, M.; LIRA, S.A.; GORMAN, D.; KASTELEIN, R. A.; SEDGWICK, J. D. (2003). Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. **Nature**, 421: 744–748;
- CURZTEK, K.; KUBERA, M.; MAJEWSKA-SZCZEPANIK, M.; SZCZEPANIK, M.; MARCINSKA, K.; PTAK, W.; DUDA, M.; LESKIEWICZ, M.; BASTA-KAIM, A.; BUDZISZEWSKA, B.; LASON, W.; MAES, M. (2013). Inhibition of 2,4-dinitrofluorobenzene-induced contact hypersensitivity reaction by antidepressant drugs. **Pharmacological Reports**, 65, 1237-1246;
- DECK, N.; LEE, W.; BERNEMAN, Z.N.; COOLS, N. (2013). Neuroendocrine Immunoregulation in Multiple Sclerosis. **Clinical and Developmental Immunology**, 2013: 1-23;
- DIECKMANN, D.; PLOTTNER, H.; BERCHTOLD, S.; BERGER, T.; SCHULER, G. (2001). Ex vivo isolation and characterization of CD4(+) CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. **J. Exp. Med.**, 193: 1303–1310;
- DUSTIN, M. L.; TSENG, S. Y.; VARMA, R.; CAMPI, G. (2006). T-cell-dendritic cell immunological synapses. **Cur OpinImmunol.**, 18: 512-16;
- EL-SALHY, M.; GUNDERSEN, D.; HATLEBAKK, J.G.; HAUSKEN, T. (2012). High densities of serotonin and peptide YY cells in the colon of patients with lymphocytic colitis. **World J Gastroenterol**, 18(42): 6070-6075;

ENDHARTI, A.T.; RIFA, I.M.; SHI, Z. et al (2005). Cutting edge: CD8⁺ CD122⁺ regulatory T cells produce IL-10 to suppress IFN γ production and proliferation of CD8⁺ T cells. **J Immunol.**, 175: 7093–7097;

ESIRI, M.M. (1977). Immunoglobulin-containing cells in multiple-sclerosis plaques. **Lancet**, 2: 478;

FALCON, S. (2009). Autoimmune T cell responses in the central nervous system. **Nat Rev Immunol.**, 9: 407;

FALLARINO, F.; GROHMANN, U.; HWANG, K.W.; ORABONA, C.; VACCA, C.; BIANCHI, R.; BELLADONNA, M.L.; FIORETTI, M.C.; ALEGRE, M.L.; PUC CETTI, P. (2003). Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. **Nat Immunol.**, 4: 1206–12;

FANG, C.; CHEN, H.; CHIANG, I.; CHEN, C.; LIAO, J.; SU, T.; TUNG, C.; UCHITOMI, Y.; HWANG, J. (2012). Mirtazapine Inhibits Tumor Growth via Immune Response and Serotonergic System. **PLoS ONE** 7(7): e38886;

FANTINI, M.C.; BECKER, C.; MONTELEONE, G.; PALLONE, F.; GALLE, P.R.; NEURATH M.F. (2004). Cutting edge: TGF- β induces a regulatory phenotype in CD4⁺CD25⁻ T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. **J Immunol.**, 172: 5149–5153;

FARBER, R.S.; SAND, I.K. (2015). Optimizing the initial choice and timing of therapy in relapsing–remitting multiple sclerosis. **Ther Adv Neurol Disord.**, 8(5):212-232;

FASSAS, A.; ANAGNOSTOPOULOS, A.; KAZIS, A.; KAPINAS, A.; SAKELLARI, I.; KIMISKIDIS, V.; et al. (1997). Peripheral blood stem cell transplantation in the treatment of progressive multiple sclerosis: first results of a pilot study. **Bone Marrow Transplant.**, 20(8):631–8;

FASSAS, A.; MANCARDI, G.L. (2008). Autologous hemopoietic stem cell transplantation for multiple sclerosis: is it worthwhile? **Autoimmunity**, 41(8): 601–10;

FAZILLEAU, N.; MCHEYZER-WILLIAMS, L.J.; MCHEYZER-WILLIAMS, M.G. (2007). Local development of effector and memory T helper cells. **Cur Opin Immunol.**, 19: 259-67;

FERBER, I.A.; BROCK, S.; TAYLOR-EDWARDS, C.; RIDGWAY, W.; DINISCO, C.; STEINMAN, L.; DALTON, D.; FATHMAN, C.G. (1996). Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). **J. Immunol.**, 156: 5–7;

FERREIRA, T.B.; BARROS, P.O.; TEIXEIRA, B.; CASSANO, T.; CENTURIÃO, N.; KASAHARA, T.M.; HYGINO, J.; VASCONCELOS, C.C., FILHO, H.A.; ALVARENGA, R.; WING, A.C.; ANDRADE, R.M.; ANDRADE, A.F.; BENTO, C.A. (2014). Dopamine favors expansion of glucocorticoid-resistant IL-17-producing T cells in multiple sclerosis. **Brain Behav Immun.**, 41: 182-90;

FERREIRA, T.B.; KASAHARA, T.M.; BARROS, P.O.; VIERIA, M.M.; BITTENCOURT, V.C.; HYGINO, J.; ANDRADE, R.M.; LINHARES, U.C.; ANDRADE, A.F.; BENTO, C.A. (2011). Dopamine up-regulates Th17 phenotype from individuals with generalized anxiety disorder. **J Neuroimmunol.**, 238(1-2): 58-66;

FIEBICH, B.L.; AKUNDI, R.S.; SEIDEL, M.; GEYER, V.; HAUS, U.; MÜLLER, W.; STRATZ, T.; CANDELARIO-JALIL, E. (2004). Expression of 5-HT_{3A} receptors in cells of the immune system. **Scand. J. Rheumatol. Suppl.**, 119: 9–11.

FILIP, S.; MOKRÝ, J.; VÁVROVÁ, J.; CÍZKOVÁ, D.; SINKOROVÁ, Z.; TOSNEROVÁ, V.; ET AL. (2009). Homing of lin⁻/CD117⁺ hematopoietic stem cells. **Transfus Apher Sci.**, 41(3): 183–90;

FOLEY, P.; LAWLER, A.; CHANDRAN, S. *et al.* (2014). Potential disease-modifying effects of selective serotonin reuptake inhibitors in multiple sclerosis: systematic review and meta-analysis. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, 85: 709-710;

FONTENOT, J.D.; RASMUSSEN, J.P.; WILLIAMS, L.M.; DOOLEY, J.L.; FARR, A.G.; RUDENSKY, A.Y. (2005). Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. **Immunity**, 22: 329–341;

GAGLIANI, N.; MAGNANI, C.F.; HUBER, S.; GIANOLINI, M.E.; PALA, M.; LICONA-LIMON, P.; GUO, B.; HERBERT, D.R.; BULFONE, A.; TRENTINI, F.; DI SERIO, C.; BACCHETTA, R.; ANDREANI, M.; BROCKMANN, L.; GREGORI, S.; FLAVELL, R.A.; RONCAROLO, M.C. (2013). Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. **Nat Med.**, 19(6):739-46;

GANDHI, R.; KUMAR, D.; BURNS, E.J.; et al. (2010). Activation of the aryl hydrocarbon receptor induces human type 1 regulatory T cell-like and Foxp3(+) regulatory T cells. **Nat Immunol.**, 11: 846–853;

GENAIN, C.P.; CANNELLA, B.; HAUSER, S.L.; RAINE, C.S. (1999). Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. **Nat. Med.**, 5: 170–75;

GERSHON, R.K.; KONDO, K. (1970). Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. **Immunology**, 18: 723–737;

GOBIN, V.; STEENDAM, K.V.; FEVERY, S.; TILLEMANN, K.; BILLIAU, A.D.; DENYS, D.; DEFORCE, D.L. (2013). Fluoxetine Reduces Murine Graft-Versus-Host Disease by Induction of T cell Immunosuppression. **J NeuroimmunePharmacol**, 8: 934–943;

GRAN, B.; ZHANG, G.X.; YU, S.; LI, J.; CHEN, X.H.; VENTURA, E.S.; KAMOUN, M.; ROSTAMI, A. (2002). IL-12p35-deficient mice are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis:evidence for redundancy in the IL-12 system in the induction of central nervous system autoimmune demyelination. **J. Immunol.**, 169: 7104–7110;

GROHMANN, U.; ORABONA, C.; FALLARINO, F.; VACCA, C.; CALCINARO, F.; FALORNI, A.; CANDELORO, P.; BELLADONNA, M.L.; BIANCHI, R.; FIORETTI, M.C.; PUCCHETTI, P. (2002). CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. **Nat. Immunol.**, 3: 1097–1101;

GUTCHER, I.; BECHER, B. (2007). APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation.**J. Clin. Invest.**, 117: 1119-27;

HAAS, J.; SCHWARZ, A.; KORPORAL-KUNKE, M.; JARIUS, S., et al. (2014). Fingolimod does not impair T-cell release from the thymus and beneficially affects

Treg function in patients with multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis Journal**, 1–12;

HAMADA, H.; GARCIA-HERNANDEZ, MDE. L.; REOME, J.B.; MISRA, S.K.; STRUTT, T.M.; MCKINSTRY, K.K.; COOPER, A.M.; SWAIN, S.L.; DUTTON, R.W. (2009). TC17, a unique subset of CD8 T cells that can protect against lethal influenza challenge. **J Immunol.**, 182: 3469-81;

HASHIMOTO, K.; INOUE, T.; HIGASHI, T.; TAKEI, S.; AWATA, T.; KATAYAMA, S.; TAKAGI, R.; OKADA, H.; MATSUSHITA, S. (2009). Dopamine D1-like receptor antagonist, SCH23390, exhibits a preventive effect on diabetes mellitus that occurs naturally in NOD mice. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 383: 460–463;

HENRICKSON, S.E.; VON ADRIAN, U.H. (2007). Single-cell dynamics of T-cell priming. **Cur OpinImmunol.**, 19: 249-58;

HOANG, H.; LAURSEN, B.; STENAGER, E.N.; STENAGER, E. (2016). Psychiatric co-morbidity in multiple sclerosis: The risk of depression and anxiety before and after MS diagnosis. **Mult Scler.**, 22(3): 347-53;

HUGUES, S.; BOISSONNAS, A.; AMIGORENA, S.; FETLER, L. (2006). The dynamics of dendritic cell-T cell interactions in priming and tolerance. **Cur OpinImmunol.**, 18: 491-95;

HUSTER, K. M.; STEMBERG, C.; BUSH, G. H. (2006). Protective immunity towards intracellular pathogens. **CurrOpinImmunol.**, 18: 458-64;

INOUE, M.; OKAZAKI, T.; KITAZONO, T.; MIZUSHIMA, M.; OMATA, M.; OZAKI, S. (2011). Regulation of antigen-specific CTL and Th1 cell activation through 5-Hydroxytryptamine 2A receptor. **IntImmunopharmacol.**, 11: 67-73;

JAFARI, M.; AHANGARI, G.; SABERI, M.; SAMANGOUI, S.; TORABI, R.; ZOUALI, M. (2013). Distorted expression of dopamine receptor genes in systemic lupus erythematosus. **Immunobiology**, 218: 979-83;

JIANG, H.; CANFIELD, S.M.; GALLAGHER, M.P.; JIANG, H.H.; JIANG, Y.; ZHENG, Z.; CHESS, L. (2010). HLA-E-restricted regulatory CD8(+) T cells are

involved in development and control of human autoimmune type 1 diabetes. **J Clin Invest.**, 120: 3641–3650;

KATO, S. (2013). Recent Advances in 5-Hydroxytryptamine (5-HT) Receptor Research: How Many Pathophysiological Roles Does 5-HT Play via Its Multiple Receptor Subtypes? **Biol. Pharm. Bull.**, 36(9): 1406–1409;

KEBIR, H.; IFERGAN, I.; ALVAREZ, J.I.; BERNARD, M.; POIRIER, J.; ARBOUR, N.; DUQUETTE, P.; PRAT, A. (2009). Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis. **Ann. Neurol.**, 66: 390–402;

KHAN, W.I.; GHIA, J.E. (2010). Gut hormones: emerging role in immune activation and inflammation. **Clinical and Experimental Immunology**, 161: 19–27;

KIESEIER, B.C. (2014). Defining a role for laquinimod in multiple sclerosis. **Ther Adv Neurol Disord.**, 7(4): 195–205;

KIM, K. (2012). Dermatitis Focused on the Role of Serotonin. **Biomol Ther.**, 20(6): 506-512;

KIM, S.; LEE, H.; LEE, G.; OH, S.; SHIN, M.; SHIM, I.; BAE, H. (2012). CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cell Depletion Modulates Anxiety and Depression-Like Behaviors in Mice. **PLoS ONE** 7(7): e42054;

KIRILLOVA, G.P.; HRUTKAY, R.J.; SHURIN, M.R.; SHURIN, G.V.; TOURKOVA, I.L.; VANYUKOV, M.M. (2008). Dopamine receptors in human lymphocytes: radioligand binding and quantitative RT PCR assays. **J. Neurosci. Methods**, 174: 272–280;

KOCH, M.W.; GREENFIELD, J.; JAVIZIAN, O.; DEIGHTON, S.; WALL, W.; METZ, L.M. (2014). The natural history of early versus late disability accumulation in primary progressive MS. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, [S.I.], 307948;

KORNEK, B. (2005). An update on the use of natalizumab in the treatment of multiple sclerosis: appropriate patient selection and special considerations. **Patient Prefer Adherence.**, 19(9): 675-84;

KUBERA, M.; CURZTEK, K.; MAJEWSKA-SZCZEPANIK, M.; SZCZEPANIK, M.; MARCINSKA, K.; PTAK, W.; LESKIEWICZ, M.; MAES, M.; BASTA-KAIM, A.; BUDZISZEWSKA, B.; DETKA, J.; DUDA, W.; LASON, W. (2012). Inhibitory effect of antidepressant drugs on contact hypersensitivity reaction. **Pharmacological Reports**, 64: 714-722;

KUBERA, M.; LIN, A-H.; KENIS, G.; BOSMANS, E.; VAN BOCKSTAELE, D.; MAES, M. (2001). Anti-inflammatory effects of antidepressants through suppression of the interferon- γ /interleukin-10 production ratio. **J Clin Psychopharmacol.**, 21: 199–206;

KUBERA, M.; MAES, M.; BUDZISZEWSKA, B.; BASTA-KAIM, A.; LEŃKIEWICZ, M.; GRYGIER, B.; ROGÓ, Z.; LASOŃ, W. (2009). Inhibitory effects of amantadine on the production of proinflammatory cytokines by stimulated in vitro human blood. **Pharmacol Rep.**, 61, 1105–1112;

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

LANGRISH, C.L.; CHEN, Y.; BLUMENSCHNEIN, W.M.; MATTSON, J.; BASHAM, B.; SEDGWICK, J.D.; MCCLANAHAN, T.; KASTELEIN, R.A.; CUA, D. J. (2005). IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. **J. Exp. Med.**, 201: 233–240;

LAUCH, M.; TREUTLEIN, J.; BLOMEYER, D.; BUCHMANN, A.F.; SCHMID, B.; BECKER, K. *et al.* (2009). Interaction between the 5-HTTLPR serotonin transporter polymorphism and environmental adversity for mood and anxiety psychopathology: evidence from a high-risk community sample of young adults. **Int J Neuropsychopharmacol.**, 12: 737-747;

LEE, C.C.; LIN, S.J.; CHENG, P.L.; KUO, M.L. (2009). The regulatory function of umbilical cord blood CD4(+) CD25(+) T cell stimulated with anti-CD3/anti-CD28 and exogenous IL-2 or IL-15. **Pediatric Allergy Immunol.**, 20: 624-63;

LEE, Y. AND KUCHROO, V. (2015). Defining the functional states of Th17 cells [version 1; referees: 3 approved]. *F1000Research* 2015, 4(F1000 Faculty Rev): 132;

LEON-PONTE, M.; AHERN, G.P.; O'CONNEL, P.J. (2007). Serotonin provides an accessory signal to enhance T-cell activation by signaling through the 5-HT7 receptor. **Blood**, 109: 3139-46;

LEVIN, A.B.; HADGKISS, E.J.; WEILAND, T.J.; JELINEK, G.J. (2014). Meditation as an Adjunct to the Management of Multiple Sclerosis. **Neurology Research International**, 2014: 704691, 10 pages;

LEVINGS M.K.; SANGREGORIO, R.; RONCAROLO, M.G. (2001). Human CD25(+) CD4(+) T regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. **J. Exp. Med.**, 193: 1295–1302;

LEVINGS, M.K.; SANGREGORIO, R.; SARTIRANA, C. (2002). Human CD25⁺CD4⁺ T suppressor cell clones produce transforming growth factor beta, but not interleukin 10, and are distinct from type 1 T regulatory cells. **J Exp Med.**, 196: 1335–46;

LI, N.; GHIA, J.; WANG, H.; MCCLEMENS, Y.; COTE, F.; SUEHIRO, Y.; MALLETT, J.; KHAN, W.I. (2011) Serotonin Activates Dendritic Cell Function in the Context of Gut Inflammation. **Am J Pathol.**, 178:662–671;

LILL, C.M. (2014). Recent advances and future challenges in the genetics of multiple sclerosis. **Frontiers in Neurology | Multiple Sclerosis and Neuroimmunology**, 5(130), 1-4;

LINKER, R.A.; GOLD, R. (2013). Dimethyl Fumarate for Treatment of Multiple Sclerosis: Mechanism of Action ,Effectiveness, and Side Effects. **Curr Neurol Neurosci Rep.**, 13: 394;

LIU, S.J.; TSAI, J.P.; SHEN, C.R.; SHER, Y.P.; HSIEH, C.L.; YEH, Y.C.; CHOU, A.H.; CHANG, S.R.; HSIAO, K.N.; YU, F.W.; CHEN, H.W. (2007). Induction of a distinct CD8 Tnc17 subset by transforming growth factor-beta and interleukin-6. **J Leukoc Biol.**, 82: 354-60;

LIU, W.; PUTNAM, A.L.; XU-YU, Z.; SZOT, G.L.; LEE, M.R.; ZHU, S.; GOTTLIEB, P.A.; KAPRANOV, P.; GINGERAS, T.R.; FAZEKAS DE ST GROTH, B.; CLAYBERGER, C.; SOPER, D.M.; ZIEGLER, S.F.; BLUESTONE, J.A. (2006).

CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. **J Exp Med.**, 203: 1701-1711;

LIU, X.; LEE, Y.S.; YU, C.R.; EGWUAGU, C.E. (2008). Loss of STAT3 in CD4⁺ T cells prevents development of experimental autoimmune diseases. **J. Immunol.**, 180: 6070–6076;

LOCK, C.; HERMANS, G.; PEDOTTI, R.; BRENDOLAN, A.; SCHADT, E.; GARREN, H.; LANGER-GOULD, A.; STROBER, S.; CANNELLA, B.; ALLARD, J.; KLONOWSKI, P.; AUSTIN, A.; LAD, N.; KAMINSKI, N.; GALLI, S.J.; OKSENBERG, J.R.; RAINE, C.S.; HELLER, R.; STEINMAN, L. (2002). Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis, **Nat. Med.**, 8: 500–508;

LOVETT-RACKE, A.E.; YANG, Y.; RACKE, M.K. (2011). Th1 versus Th17: Are T cell cytokines relevant in multiple sclerosis? **Bioch. Bioph. Acta.**, 1812: 246–251;

LU, Y.; HONG, B.; LI, H.; ZHENG, Y.; ZHANG, M.; WANG, S.; QIAN, J.; YI, Q. (2014) Tumor-specific IL-9-producing CD8⁺ Tc9 cells are superior effector than type-I cytotoxic Tc1 cells for adoptive immunotherapy of cancers. **Proc Natl Acad Sci USA**, 111: 2265–2270;

LUBLIN, F.D.; KNOBLER, R.L.; KALMAN, B.; GOLDHABER, M.; MARINI, J.; PERRAULT, M.; D'IMPERIO, C.; JOSEPH, J.; ALKAN, S.S.; KORNGOLD, R. (1993). Monoclonal anti-gamma interferon antibodies enhance experimental allergic encephalomyelitis. **Autoimmunity**, 16: 267–274;

LUBLIN, F.D.; REINGOLD, S.C.; COHEN, J.A.; CUTTER, G.R. et al. (2014). Defining the clinical course of multiple sclerosis. **Neurology**, 83: 278-286;

LYCKE, J. (2015). Monoclonal antibody therapies for the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis: differentiating mechanisms and clinical outcomes. **Ther Adv Neurol Disord.**, 8(6): 274-93;

MA, A.; XIONG, Z.; HU, Y.; QI, S.; SONG, L.; DUN, H.; ZHANG, L.; LOU, D.; YANG, P.; ZHAO, Z.; WANG, X.; ZHANG, D.; DALOZE, P.; CHEN, H. (2009). Dysfunction of IL-10-producing type 1 regulatory T cells and CD4⁺CD25⁺

regulatory T cells in a mimic model of human multiple sclerosis in Cynomolgus monkeys. **InternImmunopharmacol**, 9: 599-608;

MAES, M.; SONG, C.; LIN, A-H.; BONACCORSO, S.; KENIS, G.; DE JONGH, R.; BOSMANS, E.; SCHARPE, S. (1999). Negative immunoregulatory effects of antidepressants: inhibition of interferon-g and stimulation of interleukin-10 secretion. **Neuropsychopharmacology**, 20: 370–379;

MAHNKE, K.; ENK, A. H. (2005). Dendritic cells: key cells for the induction of regulatory T cells? **Curr Top MicrobiolImmunol.**, 293: 133–150;

MAKANI, S.S.; JEN, K.Y.; FINN, P.W. (2008). New Costimulatory Families: Signaling Lymphocytic Activation Molecule in Adaptive Allergic Responses. **Cur. Mol. Med.**, 8: 359-364;

MATSUZAKI, G.; UMEMURA, M. (2007). IL-17 as an effector molecule of innate and acquired immunity against infections. **Microbiol. Immunol.**, 51: 1139-1147;

MATTSON, D.H.; ROOS, R.P.; ARNASON, B.G. (1980). Isoelectric focusing of IgG eluted from multiple sclerosis and subacute sclerosing panencephalitis brains. **Nature**, 287: 335–37;

MATUSEVICIUS, D.; KIVISAKK, P.; HE. B.; KOSTULAS, N.; OZENCI, V.; FREDRIKSON, S.; LINK, H. (1999). Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. **Mult. Scler.**, 5: 101–104;

MCGEACHY, M.J.; BAK-JENSEN, K.S.; CHEN, Y.; et al. (2007). TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain TH-17 cell-mediated pathology. **Nat Immunol.**, 8(12): 1390–1397.

MCKINSTRY, K.K.; STRUTT, T.M.; SWAIN, S.L. (2010). The potential of CD4 T-cell memory. **Immunol.**, 130(1): 1-9;

MEDRADO, D.; HYGINO, J.; FERREIRA, T.B.; KASAHARA, T.M.; BARROS, P. O.; MONTEIRO, C.; OLIVEIRA, A.; TAVARES, F.; VASCONCELOS, C.C. F.; ALVARENGA, R.; BENTO, C.A.M. (2016). Vitamin D modulates different IL-17-

secreting T cell subsets in multiple sclerosis patients. **Journal of Neuroimmunology**, 299: 8–18;

MICHEL, L.; BERTHELOT, L.; PETTRÉ, S.; WIERTLEWSKI, S.; LEFRÈRE, F.; BRAUDEAU, C.; BROUARD, S.; SOULILLOU, J.P.; LAPLAUD, D.A. (2008). Patients with relapsing-remitting multiple sclerosis have normal Treg function when cells expressing IL receptor α -chain are excluded from the analysis. **J Clin Invest**, 118: 3411-3419;

MILLS, G.B.; SCHMANDT, R.; GIBSON, S.; LEUNG, B.; HILL, M.; MAY, C.; SHI, Y.F.; BRANCH, D.R.; RADVANYI, L.; TRUITT, K.E., IMBODEN, J. (1993). Transmembrane signaling by the interleukin-2 receptor: progress and conundrums. **Semin Immunol.**, 5: 345-64;

MILO, R.; KAHANA, E. (2010). Multiple sclerosis: geoepidemiology, genetics and the environment. **Autoimmunity Reviews**, [S.I.], 9: A387-A394;

MINGUETTI, G. (2001). RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NA ESCLEROSE MÚLTIPLA: Análise de 270 casos. **Arq. Neuro-Psiquiatr.**, 59 (3A);

MIOSSEC, P. (2009). IL-17 and Th17 cells in human inflammatory diseases. **Microb. Infect.**, 11: 625-630;

MIRSHAFIEY, A.; SIMHAG, A.; EL ROUBY, N.M.; AZIZI, G. (2015). T-helper 22 cells as a new player in chronic inflammatory skin disorders. **Int J Dermatol.**, 54(8): 880-8;

MOHR, D.C.; HART, S.L.; JULIAN, L.; COX, D., PELLETIER, D. (2004). Association between stressful life events and exacerbation in multiple sclerosis: a meta-analysis. **BMJ**, 328: 731–735;

MOSMANN, T.R.; LI, L.; SAD, S. (1997). Functions of CD8 T-cell subsets secreting different cytokine patterns. **Semin Immunol.**, 9: 87-92;

MULLER, N.; RIEDEL, M.; GRUBER, R.; ACKENHEIL, M.; SCHWARZ, M.J. (2000). The immune system and schizophrenia: An integrative view. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, 917: 456–467;

MÜLLER, W.; STRATZ, T.; MUNOZ, E. (2004). Antiinflammatory effects of 5-HT₃ receptor antagonists in lipopolysaccharide stimulated primary human monocytes. **Scand. J. Rheumatol. Suppl.**, 119: 28–32;

MULS, N.G.V.; DANG, H.A.; SINDIC, C.J.M.; VAN PESCH, V. (2015). Regulation of Treg-associated CD39 in multiple sclerosis and effects of corticotherapy during relapse. **Multiple Sclerosis Journal**, 1–13;

NAKAMURA, K.; KITANI, A.; FUSS, I.; PEDERSEN, A.; HARADA, N.; NAWATA, H.; STROBER, W. (2004). TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell activity in both humans and mice. **J Immunol.**, 172: 834–42;

NAKANO, K.; HIGASHI, T.; HASHIMOTO, K.; TAKAGI, R.; TANAKA, Y.; MATSUSHITA, S. (2008). Antagonizing dopamine D1-like receptor inhibits Th17 cell differentiation: preventive and therapeutic effects on experimental autoimmune encephalomyelitis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 373: 286–291;

NELL, P.; WANG, X.; LEON-PONTE, M.; GRIFFITHS, C.; PINGLE, S.C.; AHM, G.P. (2006). A novel form of immune signaling revealed by transmission of the inflammatory mediator serotonin between dendritic cells and T cells. **Blood**, 107 (3): 1010-1017;

NIE, J.; LI, Y.Y.; ZHENG, S.G.; TSUN, A.; LI, B. (2015). FOXP3(+) Treg Cells and Gender Bias in Autoimmune Diseases. **Front Immunol.** 28(6): 493;

NURIEVA, R.; YANG, X.O.; MARTINEZ, G.; ZHANG, Y.; PANOPOULOS, A. D.; MA, L.; SCHLUNS, K.; TIAN, Q.; WATOWICH, S.S.; JETTEN, A.M.; DONG, C. (2007). Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. **Nature**, 448: 480-483;

O'CONNELL, P.; WANG, X.; LEON-PONTE, M.; GRIFFITHS, C.; PINGLE, S.C.; AHM, G.P. (2006). A novel form of immune signaling revealed by transmission of the inflammatory mediator serotonin between dendritic cells and T cells. **Blood**, 107 (3):1 010-1017;

- OBAR, J.J.; LEFRANÇOIS, L. (2010). Memory CD8⁺ T cell differentiation. **Ann N Y Acad Sci.**, 1183: 251-66;
- OH, J.; O'CONNOR, P.W. (2014). Teriflunomide in the Treatment of Multiple Sclerosis: Current Evidence and Future Prospects. **Ther Adv Neurol Disord.**, [S.I.], 7(5): 239-52;
- OKADA, H.; INOUE, T.; HASHIMOTO, K.; SUZUKI, H.; MATSUSHITA, S. (2009). D1-like receptor antagonist inhibits IL-17 expression and attenuates crescent formation in nephrotoxic serum nephritis. **Am. J. Nephrol.**, 30: 274–279;
- OKUDA, Y.; SAKODA, S.; BERNARD, C.C.; FUJIMURA, H.; SAEKI, Y.; KISHIMOTO, T.; YANAGIHARA, T. (1998). IL-6-deficient mice are resistant to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis provoked by myelin oligodendrocyte glycoprotein. **Int. Immunol.**, 10: 703–708;
- PELLEGRINO, T.C.; KAYER, B.M. (2000). Specific serotonin reuptake inhibitor-induced decreases in lymphocyte activity require endogenous serotonin release. **Neuroimmunomodulation** 8(4): 179-187;
- PENNA, G.; GIARRATANA, N.; AMUCHASTEGUI, S. (2005). Manipulating dendritic cells to induce regulatory T cells. **Microbes Infect.**, 7: 1033–1039;
- PETERS, A.; LEE, Y.; AND KUCHROO, V.K. (2011). The many faces of Th17 cells. *Curr Opin Immunol.*, 23(6): 702–706;
- PETERSON, R.A. (2012). Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression. **Toxicol Pathol.**, 40(2):186-204;
- PICCIRILLO, C.A.; SHEVACH, E.M. (2001). Cutting edge: Control of CD8⁺ T cell activation by CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory cells. **J Immunol.**, 167: 1137–1140;
- POLANCZYK, M.J.; CARSON, B.D.; SUBRAMANIAN, S.; AFENTOULIS, M.; VANDENBARK, A.A.; ZIEGLER, S.F.; OFFNER, H. (2004). Cutting edge: estrogen drives expansion of the CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell compartment. **J Immunol.**, 173: 2227–2230;
- POLANCZYK, M.J.; HOPKE, C.; VANDENBARK, A.A.; OFFNER, H. (2006). Estrogen mediated immunomodulation involves reduced activation of effector T

cells, potentiation of Treg cells, and enhanced expression of the PD-1 costimulatory pathway. **J Neurosci Res.**, 284: 370–378;

PRASAD, H.C.; STEINER, J.A.; SUTCLIFFE, J.S.; BLAKELY, R.D. (2009). Enhanced activity of human serotonin transporter variants associated with autism. **Philos Trans R Soc Lond B BiolSci.**, 364: 163-173;

PROCACCINI, C.; PUCINO, V.; MANTZOROS, C.S.; MATARESE, G. (2015). Leptin in autoimmune diseases. **Metabolism.**, 64(1): 92-104;

RAMGOLAM, V.S.; MARKOVIC-PLESE, S. (2010). Interferon-beta inhibits Th17 cell differentiation in patients with multiple sclerosis. **Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.**, 10(2): 161-7;

RES, P.C.; PISKIN, G.; DE BOER, O.J.; LOOS, C.M.V.D.; TEELING, P.; BOS J.D.; TEUNISSEN, M.B..M. (2010). Overrepresentation of IL-17A and IL-22 producing CD8 T cells in lesional skin suggests their involvement in the pathogenesis of psoriasis. **PLoS One**, 5:e14108;

RINALDI, A.; CHIARAVALLI, A.M.; MIAN, M.; ZUCCA, E.; TIBILETTI, M.G.; CAPELLA, C.; BERTONI, F. (2010). Serotonin receptor 3A expression in normal and neoplastic B cells. *Pathobiology*, 77: 129–135;

RONCAROLO, M.G.; BACCHETTA, R.; BORDIGNON, C.; NARULA, S.; LEVINGS, M.K. (2001). Type 1 T regulatory cells. **Immunol Rev.**, 182: 68–79;

SABBAN, E.L.; KVETŇANSKÝ, R. (2001). Stress-triggered activation of gene expression in catecholaminergic systems: dynamics of transcriptional events. **Trends in Neurosciences**, 24: 91-98;

SAITO, S.; SHIMA, A.; NAKASHIMA, A.; SHIOZAKI, A.; ITO, M.; SASAKI, Y. (2007). What is the role of regulatory T cells in the success of implantation and early pregnancy? **J Assist Reprod Genet.**, 24: 379–386;

SCHUMACHER, G.A.; KIBLER, B.G.; KURLAND, L.T.; KURTZKE, J.F.; MCDOWELL, F.; NAGLER, B.; SIBLEY, W.A.; TOURTELLOTTE, W.W.; WILLMON, T.L. (1965). Problems of experimental trials of therapy in multiple

sclerosis: report by the panel on evaluation of experimental trials of therapy in multiple sclerosis. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 122: 552-568;

SCHUMANN, R., ADAMASZEK, M., SOMMER, N., KIRKBY, K.C. (2012). Stress, depression and antidepressant treatment options in patients suffering from multiple sclerosis. **Curr. Pharm. Des.**, 18 (36): 5837–5845;

SEGAL, J.; SCHENKEL, L.C.; OLIVEIRA, M.H.; SALUM, G.A.; BAU, C.H.; MANFRO, G.G.; LEISTNER-SEGAL, S. (2009). Novel allelic variants in the human serotonin transporter gene linked polymorphism (5-HTTLPR) among depressed patients with suicide attempt. **NeurosciLett**, 451: 79-82;

SELMI, C.; LEUNG, P.S.C.; SHERR, D.H.; DIAZ, M.; NYLAND, J.F.; MONESTIER, M.; ROSE, N.R.; GERSHWIN, M.E. (2012). Mechanisms of environmental influence on human autoimmunity: A national institute of environmental health sciences expert panel workshop. **J Autoimmun.**, 39: 272-284;

SELYE, H. (1977). Stress in Health and Disease. **Ann Intern Med.**, 87: 799-805;

SHEVACH, E.M.; DIPAOLO, R.A.; ANDERSSON, J.; ZHAO, D.M.; STEPHENS, G.L.; THORNTON, A.M. (2006). The lifestyle of naturally occurring CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. **Immunol. Rev.**, 212: 60–73;

SHI, G.; VISTICA, B.; LOVAAS, J.; TANG, C.; MAZIZ, M.; AND IGERY, I. (2010). Pathogenic or non-pathogenic subpopulations of Th17 cells are generated by stimulation of naïve CD4 cells via antigen/APC or anti-CD3/CD28 antibodies (135.10). *The Journal of Immunology*, 184;

SKULINA, C.; SCHMIDT, S.; DORNMAIR, K.; BABBE, H.; ROERS, A.; RAJEWSKY, k. et al. (2004). Multiple sclerosis: Brain-infiltrating CD8⁺ T cells persist as clonal expansions in the cerebrospinal fluid and blood. **PNAS**, 101 (8): 2428–2433;

SKURKOVICH, S.; BOIKO, A.; BELIAEVA, I.; BUGLAK, A.; ALEKSEEVA, T.; SMIRNOVA, N.; KULAKOVA, O.; TCHECHONIN, V.; GUROVA, O.; DEOMINA, T.; FAVOROVA, O.O.; SKURKOVIC, B.; GUSEV, E. (2001). Randomized study of

antibodies to IFN-gamma and TNF alpha in secondary progressive multiple sclerosis. **Mult. Scler.**, 7: 277–284;

SMITH, T.R.; KUMAR, V. (2008). Revival of CD8+ Treg-mediated suppression. **Trends Immunol.**, 29: 337–342;

SMOLDERS, J.; THEWISSEN, M.; PEELEN, E.; MENHEERE, P.; TERVAERT, J. W. C.; DAMOISEAUX, J.; HUPPERTS, R. (2009). Vitamin D status is positively correlated with regulatory T cell function in patients with multiple sclerosis. **PLOS ONE**, 4: e6635;

SNIR, O.; HESSELBERG, E.; AMOUDRUZ, P.; KLARESKOG, L.; ZAREA-GANJI, I.; CATRINA, A.L.; PADYKOW, L.; MALMSTROM, V.; SEDDIGHZADEH, M. (2013). Genetic variation in the serotonin receptor gene affects immune responses in rheumatoid arthritis. **Genes and Immunity**, 14: 83–89;

SOGA, F.; KATOH, N.; INOUE, T.; KISHIMOTO, S. (2007). Serotonin activates human monocytes and prevents apoptosis. **J Invest Dermatol.**, 127(8): 1947-55;

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

SPILLER, R.; LAM, C. (2012). An Update on Post-infectious Irritable Bowel Syndrome: Role of Genetics, Immune Activation, Serotonin and Altered Microbiome. **J Neurogastroenterol Motil**, 18(3): 258-68;

STEFULJ, J.; JERNEJ, B.; CICIN-SAIN, L.; RINNER, I.; SCHAUENSTEIN, K. (2000). mRNA expression of serotonin receptors in cells of the immune tissues of the rat. **Brain Behav. Immun.**, 14: 219–224.

STEINBRINK, K.; JONULEIT, H.; MÜLLER, G.; SCHULER, G.; KNOP, J.; ENK, A.H. (1999). Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanomaantigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. **Blood**, 93: 1634–1642;

STEINMAN, L. (2001). Multiple sclerosis: a two-stage disease. **Nat. Immunol.**, 2: 762–764;

- STEPHENS, L. A.; MOTTET, C.; MASON, D.; POWRIE, F. (2001). Human CD4 (+) CD25(+) thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity in vitro. **Eur. J. Immunol.**, 31: 1247–1254;
- SUPPIEJ, A.; CAINELLI, E. (2014). Cognitive dysfunction in pediatric multiple sclerosis. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, 10: 1385–1392;
- TAI, P.; WANG, J.; JIN, H.; SONG, X.; YAN, J.; KANG, Y.; ZHAO, L.; AN, X.; DU, X.; CHEN, X.; WANG, S.; XIA, G.; WANG, B. (2008). Induction of regulatory T cells by physiological level estrogen. **J Cell Physiol.**, 214 (2): 456-64;
- TALER, M.; GIL-AD, I.; KOROK, I.; WEIZMAN, A. (2011). The immunomodulatory effect of the antidepressant sertraline in an experimental autoimmune encephalomyelitis mouse model of multiple sclerosis. **Neuroimmunomodulation**, 18(2): 117-122;
- TALER, M.; GIL-AD, I.; LOMNISTKI, L.; KOROV, I.; BAHARAV, E.; BAR, M.; ZOLOKOV, A.; WEIZMAN, A. (2007). Immunomodulatory effect of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) on human T lymphocyte function and gene expression. **Eur Neuropsychopharmacol**, 17(12): 774-780;
- TAN, I.J.; PEEVA, E.; ZANDMAN-GODDARD, G. (2015). Hormonal modulation of the immune system - A spotlight on the role of progestogens. **Autoimmun Rev.**, 14(6): 536-42;
- TARAZONA, R.; GONZALEZ-GARCIA, A.; ZAMZAMI, N.; MARCHETTI, P.; FRECHIN, N.; GONZALO, J.A.; RUIZ-GAYO, M.; VAN ROOIJEN, N.; MARTINEZ, C.; KROEMER, G. (1995). Chlorpromazine amplifies macrophage-dependent IL-10 production in vivo. **J. Immunol.**, 154: 861–870;
- TSUCHIDA, Y.; HATAO, F.; FUJISAWA, M.; MURATA, T.; KAMINISHI, M.; SETO, Y.; HORI, M.; OZAKI, H. (2011). Neuronal stimulation with 5-hydroxytryptamine 4 receptor induces anti-inflammatory actions via $\alpha 7$ ACh receptors on muscularis macrophages associated with postoperative ileus. **Neurogastroenterology**, 60: 638-647;
- VAN WIJMEERSCH, B.; SPRANGERS, B.; DUBOIS, B.; WAER, M.; BILLIAU, A.D. (2008). Autologous and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

for multiple sclerosis: perspective on mechanisms of action. **J Neuroimmunol.**, 197(2): 89–98.

VENKEN, K.; HELLINGS, N.; BROEKMANS, T.; HENSEN, K.; RUMMENS, J. L.; STINISSEN, P. (2008). Natural Naive CD4+CD25+CD127low Regulatory T Cell (Treg) Development and Function Are Disturbed in Multiple Sclerosis Patients: Recovery of Memory Treg Homeostasis during Disease Progression. **J Immunol.**, 180: 6411-6420;

VENKEN, K.; HELLINGS, N.; THEWISSEN, M.; SOMERS, V.; HENSEN, K.; RUMMENS, J.L.; MEDAER, R.; HUPPERTS, R.; STINISSEN, P. (2007). Compromised CD4+ CD25high regulatory T-cell function in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is correlated with a reduced frequency of FOXP3-positive cells and reduced FOXP3 expression at the single-cell level. **Immunol.**, 123: 79–89;

VIGLIETTA, V.; BAECHER-ALLAN, C.; WEINER, H.L.; HAFLER, D.A. (2004). Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med.*, 199(7): 971–979;

VIGNALI, D.A.; COLLISON, L.W.; WORKMAN, C.J. (2008). How regulatory T cells work. **Nat. Rev. Immunol.**, 8: 523–532;

VOLLMAR, P.; NESSLER, S.; KALLURI, S.R.; HARTUNG, H.P.; HEMMER, B. (2009). The antidepressant venlafaxine ameliorates murine experimental autoimmune encephalomyelitis by suppression of pro-inflammatory cytokines. **Int J Neuropsychopharmacol**, 12(4): 525-536;

VOSOUGHI, R.; FREEDMAN, M.S. (2010). Therapy of MS. **Clin Neurol Neurosurg.**, 112(5): 365–85;

WALKER, M.R.; CARSON, B.D., NEPOM, G.T.; ZIEGLER, S.F.; BUCKNER, J.H. (2005). De novo generation of antigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cells from human CD4+CD25- cells. **Proc Nat Acad Sci.**, 102: 4103-4108;

WATSON, T.M.; FORD, E.; WORTHINGTON, E.; LINCOLN, N.B. (2014). Validation of Mood Measures for People with Multiple Sclerosis. **Int J MS Care.**, 16: 105–109;

WATTS, C.; ZARU, R.; PRESCOTT, A. R.; WALLIN, R. P.; WEST, M. A. (2007). Proximal effects of Toll-like receptor activation in dendritic cells. **Cur Opin Immunol.**, 19: 73-8;

WAWRZYNIAK, M.; OCHSNER, U.; WIRZ, O.; WAWRZYNIAK, P.; VAN, D.E. ; VEEN, W.; AKDIS, C.A.; AKDIS, M. (2016). A novel, dual cytokine-secretion assay for the purification of human Th22 cells that do not co-produce IL-17A. **Allergy.**, 71(1): 47-57;

WEINSTEIN, L.I.; REVUELTA, A.; PANDO, R.H. (2015). Catecholamines and acetylcholine are key regulators of the interaction between microbes and the immune system. *Ann N Y Acad Sci.*, 1351: 39-51;

WILLENBORG, D. O.; FORDHAM, S.; BERNARD, C. C.; COWDEN, W. B.; RAMSHAW, I. A. (1996). IFN γ plays a critical down-regulatory role in the induction and effector phase of myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis. **J. Immunol.**, 157: 3223–3227;

WILLIAMS, L.M.; AND RUDENSKY, A.Y. (2007). Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nat. Immunol.*, 8: 277–284;

WING, A.C.; HYGINO, J.; FERREIRA, T.B.; KASAHARA, T.M.; BARROS, P.O.; SACRAMENTO, P.M.; ANDRADE, R.M.; CAMARGO, S.; RUEDA, F.; ALVES-LEON, S.V.; VASCONCELOS, C.C.; ALVARENGA, R.; BENTO, C.A. (2015). Interleukin-17- and interleukin-22-secreting myelin-specific CD4(+) T cells resistant to corticoids are related with active brain lesions in multiple sclerosis patients. **Immunology.**, 147(2): 212-20;

WING, K.; EKMARK, A.; KARLSSON, H.; RUDIN, A.; SURI-PAYER, E. (2002). Characterization of human CD25+ CD4+ T cells in thymus, cord and adult blood. **Immunol.**, 106: 190–199;

WOGNUM, A.W.; EAVES, A.C.; THOMAS, T.E. (2003). Identification and isolation of hematopoietic stem cells. **Arch Med Res.**, 34(6): 461–75;

- XIA, Z.; DEPIERRE, J.W.; NÄSSBERGER, L. (1996). Tricyclic antidepressants inhibit IL-6, IL-1b and TNF-a release in human blood monocytes and IL-2 and interferon-g in T cells. **Immunopharmacology**, 34: 27–37.
- XU, L.; KITANI, A.; STROBER, W. (2010). Molecular mechanisms regulating TGF-beta-induced Foxp3 expression. **Mucosal Immunol.**, 3: 230-238;
- YE, L.; GOODALL, J.C.; ZHANG, L.; PUTINTSEVA, E.V.; LAM, B.; JIANG, L.; LIU, W.; YIN, J.; LIN, L.; LI, T.; WU, X.; YEO, G.; SHUGAY, M.; CHUDAKOV, D.M.; GASTON, H.; XU, H. (2015). TCR usage, gene expression and function of two distinct FOXP3+Treg subsets within CD4+CD25hi T cells identified by expression of CD39 and CD45RO. **Immunol Cell Biol.**, 94(3): 293-305;
- YEN, H.R.; HARRIS, T.J.; WADA, S.; GROSSO, J.F.; GETNET, D.; GOLDBERG, M.V.; LIANG, K.L.; BRUNO, T.C.; PYLE, K.J.; CHAN, S.L.; ANDERS, R.A.; TRIMBLE, C.L.; ADLER, A.J.; LIN, T.Y.; PARDOLL, D.M.; HUANG, C.T.; DRAKE, C.G. (2009). TC17 CD8 T cells: functional plasticity and subset diversity. **J Immunol.**, 183: 7161-8;
- YIN, J.; ALBERT, R.H.; TRETIAKOVA, A.P.; JAMESON, B.A. (2006). 5-HT(1b) receptors play a prominent role in the proliferation of t-lymphocytes. **J Neuroimmunol.**, 181(1-2): 68-81;
- YUAN, X.Q.; QIU, G.; LIU, X.J.; WU, Y.M.; WANG, X.Y.; LU, T.M. (2012). Fluoxetine promotes remission in acute experimental autoimmune encephalomyelitis in rats. **Neuroimmunomodulation**, 19(4): 201-208;
- YURA, M.; TAKAHASHI, I.; SERADA, M.; KOSHIO, T.; NAKAGAMI, K.; YUKI, Y.; KIYONO, H. (2001). Role of MOG-stimulated Th1 type “light up” (GFP+) CD4+ T cells for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). **J. Autoimmun.**, 17: 17–25;
- ZAGHOUBANI, H.; HOEMAN, C. M.; ADKINS, B. (2009). Neonatal immunity: faulty T-helpers and the shortcomings of dendritic cells. **Trends Immunol.**, 12: 585-91;
- ZHANG, T.; KINGWELL, E.; DE JONG, H.J.; ZHU, F.; ZHAO, Y.; CARRUTHERS, R.; et al. (2016). Association between the use of selective serotonin reuptake inhibitors and multiple sclerosis disability progression. *Pharmacoepidemiology*

and Drug Safety. Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com);

ZHANG, W.; TIAN, X.; MUMTAHANA, F.; JIAO, J.; ZHANG, T.; CROCE, K.D.; MA, D.; KONG, B.; CUI, B. (2015). The existence of Th22, pure Th17 and Th1 cells in CIN and Cervical Cancer along with their frequency variation in different stages of cervical cancer. **BMC Cancer**, 15: 717;

ZHANG, X.; MARKOVIC-PLESE, S. (2010). Interferon beta inhibits the Th17 cell-mediated autoimmune response in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. **Clin Neurol Neurosurg.**, 112(7): 641-5;

ZHOU, L.; IVANOV, I.I.; SPOLSKI, R.; MIN, R.; SHENDEROV, K.; EGAWA, T.; LEVY, D.E.; LEONARD, W.J.; LITTMAN, D.R. (2007). IL-6 programs Th17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. **Nature Immunology.**, 8: 967 – 974;

ZHU, C.; LINDLER, K.M.; OWENS, A.W.; DAWS, L.C.; BLAKELY, R.D.; HEWLETT, W.A. (2010a). Interleukin-1 Receptor Activation by Systemic Lipopolysaccharide Induces Behavioral Despair Linked to MAPK Regulation of CNS Serotonin Transporters. **Neuropsychopharmacology**, 35: 2510–2520;

ZHU, J.; YAMANE, H.; PAUL, W. E. (2010b). Differentiation of effector CD4 T cell populations. **Ann. Rev. Immunol.**, 28: 445-489.

ANEXO:



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP-UNIRIO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - UNIRIO

PARECER CONSUBSTANCIADO

TTDD:232

Assunto: Projetos de Pesquisa – Avaliação.

Protocolo CEP-UNIRIO: 0042/2011 **FR** 460879 **CAAE:** 0050.0.313.000-11

Projeto de Pesquisa: Avaliação fenotípica e funcional do Linfócitos T de pacientes com neuromielite óptica.

Versão do Protocolo e Data: 09/09/2011.

Pesquisador(a) Responsável: Cleonice Alves de Melo Bento.

Instituição: Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO.

Sumário do protocolo:

- **Objetivos:** avaliar o perfil imunológico de pacientes com neuromielite óptica (NMO) em resposta a diferentes estímulos antigênicos; avaliar a proliferação dos linfócitos T mediante ativação por diferentes antígenos e patógenos; a frequência de diferentes subpopulações de células T no sangue periférico de pacientes com Neuromielite Óptica; a frequência e a situação funcional das células dendríticas no sangue periférico dos pacientes em questão; o impacto de diferentes neurotransmissores do stress na função in vitro das células T dos pacientes com NMO; quantificar a produção in vivo e in vitro de citocinas relacionadas aos fenótipos inflamatórios e anti-inflamatórios de células T nos pacientes com NMO.

- **Súmula do Projeto:** o projeto tem como foco o estudo da neuromielite óptica, doença desmielinizante do sistema nervosa central. O status funcional de células imunológicas de pacientes será avaliado. Serão utilizados pacientes do Hospital da Lagoa, com critério de inclusão o diagnóstico dos diversos tipos de NMO, e exclusão obesidade mórbida, consumo de álcool e tabaco. Ocorrerá a coleta de 20 mL de sangue para quantificação de células imunológicas e estudo de cultura de células para avaliação de proliferação e viabilidade celular. Para as análises estatísticas serão utilizados testes não paramétricos.

- **Comentários do Relator:** projeto de relevância científica e adequadamente discutido na sua introdução, justificativa e metodologia. Foi descrito o destino da cultura de celular; definição pelo pesquisador do período de tempo para seleção dos pacientes na metodologia e/ou esgotamento amostral; O cronograma está adequado.

- **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido:** está de acordo com as Normas da Resolução 196/96.



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP-UNIRIO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - UNIRIO

- O sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.
- O pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

- Informo que a autorização para posterior publicação fica condicionada á apresentação do resumo do estudo proposto á apresentação.

Diante do exposto, o Comitê de ética em Pesquisa da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – CEP –UNIRIO, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS196/96 e suas complementares, manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

Emitimos, portanto, parecer que classifica o projeto como **APROVADO**.

Rio de Janeiro, 18 de novembro de 2011.


Fabiana Barbosa Assumpção de Souza
Coordenadora do CEP-UNIRIO

Fabiana B. Assumpção de Souza
Coordenadora
CEP - UNIRIO
PROPG-DPQ

APÊNDICE:

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Departamento de Microbiologia e Parasitologia

Laboratório de Imunofisiologia e Imunopatologia dos linfócitos T

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto

**“Avaliação fenotípica e funcional dos linfócitos T de pacientes com neuromielite
óptica”**

Título do SubProjeto:

**“Avaliação fenotípica e funcional dos linfócitos T de pacientes com neuromielite
óptica: comparação com a esclerose múltipla”**

Investigador Principal: Dr^a. Cleonice Alves de Melo Bento – Professora de Imunologia da UNIRIO.

Tels.: 2531-7906/ 2558-7586 / 9883-8948

EXPLICAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA AOS PARTICIPANTES

1.1- Propósito do estudo

O propósito desse estudo é avaliar o impacto de diferentes eventos imunes em pacientes com neuromielite óptica (NMO) e compará-los com indivíduos saudáveis e com pacientes com esclerose múltipla (EM). Assim podemos identificar alguns parâmetros que possam estar implicados na EM.

1.2- Procedimentos

Durante a consulta clínica com o médico, uma vez estabelecido o diagnóstico de EM, o médico fará algumas perguntas de relevância para o nosso estudo. Essas perguntas objetivam avaliar relatos de intercorrências clínicas de relevância imunológica, tais como o número de episódios de surtos ao ano, ocorrência de reações alérgicas e de outras imunopatologias, com definição do tipo de desordem imunológica de fundo auto-imune.

Após a entrevista e com o consentimento oral e por escrito do paciente, o médico irá colher o volume total de 20 mL de sangue periférico que será utilizado para realizar uma avaliação quantitativa e qualitativa de seu sistema imune.

1.3- Riscos e desconfortos

A aplicação das perguntas não oferece nenhum tipo de risco ou desconforto. Caso você esteja se sentindo desrespeitado, pode interrompê-lo a qualquer momento. A obtenção do sangue periférico será conduzida por seu médico e utilizará todo o material sob condições adequadas.

1.4- Benefícios

Os resultados obtidos pelo estudo serão analisados pelo nosso grupo. Estes resultados poderão fornecer informações importantes relacionadas à EM. Mas, eles podem não lhe trazer benefícios imediatos, desde que são necessários vários anos de estudos e um número elevado de pacientes. No entanto, caso os achados sejam significativos, o seu médico terá acesso a todos eles e poderá, caso julgue necessário, apresentá-los a você.

1.5- Alternativas para a participação

Sua participação nesse estudo é voluntária. Você poderá interromper a entrevista ou não permitir a coleta de seu sangue a qualquer momento, sem nenhum problema para você.

Você também poderá se retirar do estudo a qualquer momento sem nenhum prejuízo quanto ao seu atendimento pela equipe médica hospitalar.

1.6- Custos e compensações

Você não pagará nada para participar nesse estudo. Você não será pago por estar no estudo.

1.7- Confidenciabilidade

Este estudo envolve informações confidenciais. Essas informações serão mantidas estritamente confidenciais entre os membros envolvidos na pesquisa. Qualquer publicação científica dos resultados não identificará você.

1.8- Direito para se retirar da pesquisa

Sua participação é voluntária. Você não é obrigado a participar desta pesquisa. Você é livre para interromper a qualquer momento sua participação.

1.9- Perguntas ou problemas

Se você tem alguma pergunta ou problema quanto a esse estudo, entre em contato com Dr^a. Regina Maria Papais Alvarenga ou Dr^a. Cleonice Alves de Melo Bento, professora e Imunologista da UNIRIO (tel: 2264-2723 ou 2531-7906).

1.10- Consentimento

Uma vez que você leu (ou lhe foi explicado) e entendeu o propósito desse estudo, os procedimentos que serão realizados, os riscos e benefícios, e você **VOLUNTARIAMENTE** concorda em fazer parte desse estudo, favor assinar seu nome abaixo:

Nome do Indivíduo entrevistado:

Assinatura do Indivíduo entrevistado:

Eu expliquei o propósito do estudo para o paciente. Ao meu entender, ela entendeu o propósito, procedimentos, riscos e benefícios desse estudo.

Nome do Investigador:

Assinatura do Investigador:

Testemunha:

Assinatura da Testemunha:

Data: