

GABRIELE CERQUEIRA SANT'ANNA

**PERFIL DA NEUROINFLAMAÇÃO EM GRUPOS ÉTNICOS
DISTINTOS DE PACIENTES COM ESCLEROSE
MÚLTIPLA DA REGIÃO SUDESTE DO BRASIL**

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

GABRIELE CERQUEIRA SANT'ANNA

**PERFIL DA NEUROINFLAMAÇÃO EM GRUPOS ÉTNICOS
DISTINTOS DE PACIENTES COM ESCLEROSE MÚLTIPLA DA
REGIÃO SUDESTE DO BRASIL**

Orientadora

Profa. THEREZA QUÍRICO-SANTOS

Dissertação submetida à Coordenação do curso de pós-graduação de Neuroimunologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal Fluminense, como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Neuroimunologia – área de concentração Patologia Celular.

Banca Examinadora:

Dra. Luzia Maria de Oliveira Pinto – Departamento de Imunologia, FIOCRUZ/RJ

Prof. Alberto Nóbrega – Departamento de Imunologia , UFRJ

Prof. José Mauro Granjeiro – Departamento de Biologia Celular e Molecular, UFF

Profa Jussara Machado Lagrota-Cândido – Departamento de Imunobiologia, UFF

(revisora e suplente)

**Niterói
2007**

A parte experimental deste trabalho foi executada no Laboratório de Patologia Celular do Departamento de Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal Fluminense (UFF) com suporte financeiro da CAPES e o estudo clínico, no ambulatório do Serviço de Doenças desmielinizantes do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF- UFRJ) e no Serviço de Neurologia da Universidade de São Paulo (Ribeirão Preto).

FICHA CATALOGRÁFICA

XXXX SANT'ANNA, GABRIELE CERQUEIRA

Perfil da neuroinflamação em grupos étnicos distintos de pacientes com Esclerose Múltipla da região sudeste do Brasil -Niterói: UFF, Instituto de Biologia, 2007

Dissertação – Mestrado em Neuroimunologia

Referências Bibliográficas: f.:

1. Esclerose múltipla 2. Desmielinização 3. Autoimunidade 4. Metaloproteinase 5. Citocinas 6. Neuroinflamação 7. Etnia

*Dedico esta tese, em especial aos meus pais e à
toda minha família, ao Felipe e amigos*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a Deus que está em tempo integral ao meu lado, iluminando o meu caminho, dando-me saúde, alegria e forças.

Aos meus pais, pelo esforço incondicional para sempre me dar o melhor que podiam e não podiam. Obrigada pelo apoio e incentivo e todo amor que vocês me dão!

À professora Thereza Quírico, pela forma que me orientou desde o início, acreditando sempre no meu potencial. Ela nos motiva pela demonstração de todo seu conhecimento, pela sua dedicação e atenção, pela sua exigência conosco.

Às minhas irmãs, pelo apoio e compreensão em todas as horas.

Ao Felipe, que está ao meu lado nos momentos bons e turbulentos, encorajando-me e incentivando-me a prosseguir.

A Regina, que compartilha dias de ansiedade e dias de sucesso. Obrigada por me ajudar em cada detalhe no laboratório.

A Soniza, pela empolgação e pela experiência compartilhada na parte clínica desse trabalho.

Ao Prof. Amilton Barreira, que com toda simpatia, e sem hesitação, abriu as portas do seu laboratório na Universidade de São Paulo (USP - Ribeirão Preto) para compartilhar o trabalho realizado.

A todos do laboratório de Patologia Celular, alunos e técnicos, pela ajuda sempre que necessário, em especial aos alunos Guilherme Fortes, Ivna Magalhães e Fernanda Mansur que participaram diretamente nesse trabalho.

Aos amigos de estudo Daniel, Márcia e Pablo que foram essenciais dando força no ingresso no mestrado e ao longo dele também.

A todos aqueles que não foram citados diretamente aqui nesses agradecimentos e que tiveram extrema importância na minha formação acadêmica.

EPÍGRAFE

“Há pessoas que desejam saber só por saber e isso é curiosidade; outras, para alcançarem fama, e isso é vaidade; outras para enriquecerem com a ciência e isso é um negócio torpe; outros para edificarem os outros, e isso é caridade.”

São Tomás de Aquino

SUMÁRIO

Ficha Catalográfica	v
Dedicatória	vi
Agradecimentos	vii
Epígrafe	viii
Abreviaturas e Siglas	xi
Lista de Figuras	xiii
Resumo	xv
Abstract	xvi
1. Introdução	1
1.1 Características gerais da Esclerose Múltipla	1
1.2 Etiopatogenia da EM	4
1.2.1 Influências genéticas na EM	4
1.2.2 Influências ambientais na patogenia da EM	6
1.3 Principais antígenos encefalitogênicos do SNC	9
1.4 Papel dos Linfócitos B na fisiopatologia da EM	11
1.5 Neuroinflamação	13
1.6 Importância das citocinas na EM	16
1.7 Importância das gelatinases e quimiocinas na EM	18
1.8 Influência da etnia na EM	22
2. Objetivo	24
2.1 Objetivo Geral	24
2.2 Objetivos específicos	24
3. Material e Métodos	25
3.1 Grupo de estudo	25
3.2 Amostras	26
3.3 Dosagem de imunoglobulinas reativas para componentes da mielina	26
3.4 Dosagem de citocinas e quimiocina	28
3.5 Atividade das gelatinases (MMP-2 e MMP-9)	29

3.6	Análise estatística	30
4.	Resultados	31
4.1.	Influência da etnia na produção de IgG e IgA para antígenos da mielina	31
4.2.	Níveis séricos de citocinas e quimiocina CCL-2	34
4.3	Atividade das gelatinases	40
4.4	Possível influência da etnia na neuroinflamação e tempo de doença	43
5.	Discussão	47
6.	Conclusões	
7.	Perspectivas	
8.	Referências Bibliográficas	

ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Africanos Americanos
AB	Afro-Brasileiros
APC	Célula Apresentadora de Antígeno
BHE	Barreira Hematoencefálica
CA	Caucasóide
CONEP	Conselho Nacional de Ética em Pesquisa
CPO	Célula Progenitora de Oligodendrócito
CTLA-4	Antígeno Leucocitário de Linfócito Citotóxico 4
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
EAE	Encefalomielite Autoimune Experimental
EM	Esclerose Múltipla
FcR	Receptor Fc de Imunoglobulina
GFAP	Proteína Glial Fibrilar Ácida
HLA	Antígeno Leucocitário Humano de Histocompatibilidade
HRP	Peroxidase
HUCFF	Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
ICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular 1
IFN- γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IgA	Imunoglobulina do isotipo A
IgG	Imunoglobulina do isotipo G
IgM	Imunoglobulina do isotipo M
IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
KDa	QuiloDalton
LCR	Líquido cefalorraquidiano

LFA-1	Antígeno Tipo 1 Associado a Linfócito
MAG	Glicoproteína Associada à Mielina
MBP	Proteína Básica da Mielina
MCP	Proteína Quimiotática de Monócito/Macrófago
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MMP	Metaloproteinase
MOG	Glicoproteína Associada ao Oligodendrócito
MT-MMP	Metaloproteinase Associada à Membrana
OPD	Orto-fenileno diamino
OSP	Proteína específica ao oligodendrócito
PBS	Tampão Salina Fosfato
PLP	Proteolipídio
PP	Progressiva Primária
PS	Progressiva Secundária
REGA	Epítomos remanescentes glicosilados associados a autoimunidade
RNM	Ressonância Nuclear Magnética
SNC	Sistema Nervoso Central
SR	Surto Remissiva
TCR	Complexo Receptor de Antígeno de Células T
TIMP	Inibidor Tecidual de Metaloproteinase
TGF- β	Fator de Crescimento de Transformação beta
TLR	Receptor tipo toll
TMB	Tetra Metil di-hidrocloreto de Benzidina
TNF-a	Fator de Necrose Tumoral alfa
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
USP	Universidade de São Paulo
VCAM-1	Molécula de Adesão Celular Vascular 1
VLA-4	Antígeno de Ativação Tardia 4

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Modelo da hipótese higiênica	7
Figura 2	Composição lipoprotéica da bainha de mielina	11
Figura 3a	Organização estrutural da Barreira Hematoencefálica	14
Figura 3b	Organização estrutural da Barreira FCS	14
Figura 4	Entrada de células T CD4+ específicas para proteína básica da mielina para o SNC durante a indução de EAE	16
Figura 5	Hipótese da patogênese da EM	17
Figura 6	Esquema demonstrando a atividade quimiotática da CCL-2 direcionando os monócitos/macrófagos para o SNC	21
Figura 7	Imunoglobulinas reativas para seqüência MOG 92-106 considerando a etnia	32
Figura 8	Imunoglobulinas reativas para PLP segundo a etnia	33
Figura 9	Níveis séricos de TNF-alfa segundo a etnia	35
Figura 10	Níveis séricos de IL-4 segundo a etnia	36
Figura 11	Níveis séricos de IFN-gama segundo a etnia	38
Figura 12	Níveis séricos de CCL-2 segundo a etnia	39
Figura 13	Zimograma	40
Figura 14a	Atividade sérica da MMP-2	42
Figura 14b	Atividade sérica da MMP-9	42
Figura 15	Concentrações séricas de TNF-alfa em relação a etnia e o tempo da doença	45

Figura 16	Concentrações séricas de IFN-gama em relação a etnia e o tempo da doença	45
Figura 17	Concentrações séricas de IL-4 em relação a etnia e o tempo da doença	46
Figura 18	Concentrações séricas de CCL-2 em relação a etnia e o tempo da doença	46

RESUMO

Esclerose Múltipla (EM) é uma doença autoimune inflamatória do sistema nervoso central (SNC) de etiologia desconhecida, caracterizada por inflamação principalmente da substância branca e destruição total ou parcial da bainha de mielina. Contrastando com regiões de alta incidência da EM que apresentam maior prevalência em Caucasianos (CA), a doença no Brasil também acomete Afro-descendentes (AB) considerados pouco susceptíveis. Esse estudo aprovado pelo CONEP, teve como objetivo determinar as diferenças no perfil inflamatório da EM entre os grupos de pacientes EM-AB e EM-CA de cidades da região sudeste do Brasil (Rio de Janeiro e Ribeirão Preto) com influência de colonização distinta.

Na coorte foram incluídos 99 pacientes com EM clinicamente definida, sendo 50 (CA= 25; AB= 25) do Rio de Janeiro e 49 de Ribeirão Preto (RP). Os últimos eram CA e expressavam haplótipo (HLA-DR2) que confere susceptibilidade a EM nos caucasianos. Os níveis séricos de imunoglobulinas reativas IgA e IgG para os antígenos encefalitogênicos proteolípido PLP e seqüência MOG 92-106, e das citocinas IL-4, TNF-alfa, IFN-gama e CCL-2 foram determinados por enzima imunoensaio e a atividade das metaloproteinases (MMPs) -2 e -9 por gelatinase zimografia.

Inicialmente foi analisado o perfil de imunoreatividade para antígenos da mielina nos pacientes EM do Rio de Janeiro com grande miscigenação étnica. Em seguida foi realizado um estudo comparando o perfil de neuroinflamação (produção de citocinas e atividade MMPs) entre pacientes EM da cidade do Rio de Janeiro com pacientes da cidade de Ribeirão Preto apresentando características étnicas homogêneas. Foi possível observar uma diferença significativa ($p < 0,05$) nos níveis de IgG e IgA para a seqüência MOG 92-106 sendo maior nos pacientes EM-CA: IgG (CA = 643 ± 69 ; AB = 472 ± 48) e IgA (CA= 889 ± 109 ; AB= 588 ± 70). Em relação ao antígeno PLP, não foi observada diferença significativa nos níveis de IgG (EM-CA= 274 ± 21 ; -AB= 252 ± 19) e IgA (EM-CA= 366 ± 41 ; -AB= 405 ± 80) entre os grupos.

A concentração de TNF-alfa estava aumentada nos pacientes CA. Pacientes CA do grupo RP ($400,7 \pm 50,1$) apresentaram níveis mais elevados do que CA-RJ ($327,8 \pm 74,5$) e a diferença foi ainda mais significativa com valores respectivamente $p < 0,0001$ e $p < 0,05$ em comparação ao EM-AB ($191,5 \pm 59,5$). Foi observada acentuada redução ($p < 0,0001$) na produção de IL-4 nos pacientes CA de RP ($302 \pm 16,9$) em comparação com os grupos do RJ, independente da etnia CA ($986,4 \pm 125,3$) e AB ($941 \pm 100,3$). Os níveis de IFN-gama estavam mais elevados ($p < 0,001$) no grupo CA de RP ($700,3 \pm 29,9$) do que nos pacientes da cidade do RJ e independente da etnia: CA ($568,6 \pm 37,6$) e AB ($667,2 \pm 43,8$). Não foi observada diferença significativa na produção da quimiocina CCL-2 entre pacientes da cidade do RJ CA ($412,5 \pm 42,7$), AB ($407,5 \pm 44,1$) e de RP ($489,1 \pm 33,1$).

A atividade da MMP-2 nos pacientes de RP ($93,8 \pm 8,0$) era maior ($p < 0,0001$) que nos pacientes AB ($51,5 \pm 7,2$) do Rio de Janeiro e também CA ($31,79 \pm 19,06$) embora essa diferença não tenha sido significativa. Em contraste, os pacientes AB ($200,3 \pm 30,5$) e CA ($257,5 \pm 31,2$) da cidade RJ apresentaram atividade da MMP-9 semelhante, porém 2-vezes maior ($p < 0,0001$) em relação ao grupo da cidade de RP ($90,7 \pm 9,4$).

O perfil de citocinas dos pacientes do Rio de Janeiro (CA e AB) foi analisado em relação ao tempo de evolução clínica da doença: < 5 ; de 5 a 10; > 10 anos (a). Não se observou diferença significativa nos níveis de TNF-alfa nos pacientes EM-CA ($< 5a = 277,7 \pm 90,6$; 5

a 10a = $436,7 \pm 256,6$; >10a = $335,8 \pm 116,3$) durante a evolução clínica. Contudo, nos AB foi observado um aumento ($p < 0,05$) 4 vezes maior nos pacientes com mais de 10 anos de doença (<5a = $121,8 \pm 32,2$; 5 a 10a = $109,8 \pm 27,5$; >10a = $487,1 \pm 262,8$).

Não foi observada diferença significativa na produção de IFN γ entre os grupos CA e AB durante os diferentes tempos: CA (< 5 anos = $577,2 \pm 172,4$; 5 a 10 anos = $569,7 \pm 274,7$; >10 anos = $553,1 \pm 157,8$) e AB (< 5 anos = $707,3 \pm 229,9$; 5 a 10 anos = $532,0 \pm 195,4$; >10 anos = $752 \pm 161,1$).

IL-4 estava mais diminuída ($p=0,07$) no grupo dos AB ($612,3 \pm 139,3$) quando comparada com os CA ($910,1 \pm 223,7$) nos pacientes com mais tempo de doença.

Não foi observada diferença significativa na produção de CCL-2 entre os grupos CA e AB durante os diferentes tempos: CA (<5 anos = $437,1 \pm 67,85$; 5 a 10 anos = $368,4 \pm 100,7$; >10 anos = $391,4 \pm 56,70$); AB: (<5 anos = $373,0 \pm 46,18$; 5 a 10 anos = $361,0 \pm 55,23$; >10 anos = $553,1 \pm 160,2$).

Em conjunto este estudo mostra que influências étnicas são capazes de influenciar no perfil inflamatório entre diferentes grupos populacionais regionais. Os Afro-descendentes (AB) apresentaram no início da doença padrão imune regulatório (Th2) devido à alta produção de produção de IgA, IL-4 e MMP-9, enquanto pacientes CA com características étnicas mais homogênea HLA-DR2+ e pacientes AB com maior tempo de doença (>10a) apresentaram padrão Th1 com intensa produção de TNF-alfa e MMP-2 característica de inflamação ativa associada a maior morbidade. Os pacientes CA do Rio de Janeiro, com alto grau de miscigenação étnica apresentaram um perfil menos inflamatório. O estudo mostra que influências genéticas e epigenéticas modulam as características de neuroinflamação, determinando a morbidade e heterogeneidade temporal da EM numa dada população.

ABSTRACT

Multiple Sclerosis (MS) is an inflammatory autoimmune disease of the central nervous system (CNS) of unknown etiology characterized mainly by white matter inflammation and partial or total destruction of myelin sheath. Contrasting with regions presenting high MS incidence and prevalence in Caucasians (CA), the disease in Brazil also affects African (AB) descendant considered less susceptible. This study aimed to analyze differences in the inflammatory pattern of MS between ethnic groups of patients MS-CA, MS-AB from cities in the southern region of Brazil with distinct colonization influence. The cohort consisted of 99 patients with clinically definite MS. Among them 50 (AB= 25; CA= 25) were from Rio de Janeiro and 49 from Ribeirão Preto (RP) city. RP patients were CA and expressed HLA-DR2 haplotype conferring susceptibility to MS in Caucasians. Enzyme immunoassay were used to determine serum levels of reactive immunoglobulin IgA and IgG for the encephalitogen antigens proteolipid (PLP), sequence MOG 92-106 and also for cytokines IL-4, TNF-alpha, IFN-gama and CCL-2. Gelatinase zymography was used for measurement of metalloproteinases (MMP-2, MMP-9) activity. Firstly it was analysed IgG and IgA production for myelin antigens in MS patients from Rio de Janeiro City with high degree of ethnic admixture. Thereafter it was compared the pattern of neuroinflammation (cytokine production and MMPs activity) between MS patients from Rio de Janeiro with patients from Ribeirão Preto City presenting homogeneous ethnicity. It was observed a significant difference ($p < 0,05$) in IgG and IgA levels for MOG 92-106 sequence, which was higher in CA-MS than in AB-MS: IgG (CA= 643 ± 69 ; AB = 472 ± 48) e IgA (889 ± 109 AB= 588 ± 70). Regarding PLP antigen, it was not observed significant difference between groups: IgG (CA = 274 ± 21 ; AB = 252 ± 19) e IgA (CA = 366 ± 41 ; AB = 405 ± 80).

The levels of TNF-alpha were considerably increased in CA, with RP MS patients (400.7 ± 50.1) presenting higher levels than CA-RJ (327.8 ± 74.5), it was also noticed a significant difference of RP ($p < 0.0001$) and RJ ($p < 0.05$) CA-MS patients in comparison with AB descendants (191.5 ± 59.5). RP patients presented marked reduction ($p < 0.0001$) of IL-4 production (302 ± 16.9) in comparison with groups from RJ City, regardless ethnicity CA (986.4 ± 125.3) and AB (941 ± 100.3). IFN-gama levels were marked ($p < 0,0001$) increased in CA patients from RP (700.3 ± 29.9) compared to patients form RJ city, regardless ethnicity CA (568.6 ± 37.6) and AB ($667,2 \pm 43,8$). Similar production of CCL-2 chemokine was observed among groups of patients from RJ-CA (412.5 ± 42.6), -AB (407.5 ± 44.1) and from RP (489.1 ± 33.1).

MS patients from RP City presented (93.8 ± 8.0) marked MMP-2 activity ($p < 0.0001$) comparing with AB (51.5 ± 7.2) but not CA (31.79 ± 19.06) patients from RJ. In contrast, AB (200.3 ± 30.5) and CA (257.5 ± 31.2) patients from RJ showed similar MMP-9 levels but more than 2-fold increase ($p < 0.0001$) of MMP-9 activity when compared with RP patients from RP city (90.7 ± 9.4).

It was also carried out sequential analysis of cytokine production in CA and AB patients from Rio de Janeiro City with different duration of disease <5 ; 5 to 10; >10 years (y). It was not observed any significant change in TNF production in CA patients ($<5y = 277.7 \pm 90.6$; 5 to 10y = 436.7 ± 256.6 ; $>10y = 335.8 \pm 116.3$). In contrast AB patients ($<5y = 121.8 \pm 32.2$; 5 to 10y = 109.8 ± 27.5 ; $>10y = 487.1 \pm 262.8$) with $>10y$ of disease duration

showed 4-fold ($p < 0.05$). It was not observed any significant difference of IFN γ production between CA and AB groups. IL-4 levels were reduced ($p = 0.07$) in AB (612.3). It was not observed any significant difference of CCL-2 production between CA and AB groups. Altogether this study indicate that ethnicity is capable of influence the pattern of neuroinflammation among individuals of regional populations. Afro-descendants (AB) MS patients showed at early stages of disease a Th2 regulatory profile characterized by increased production of IgA, IL-4 and MMP-9. In contrast, CA patients with homogeneous ethnicity (HLA-DR2+) and AB with longer duration of disease ($>10y$) showed Th1 pattern with marked production of TNF α and MMP-2, which was associated with morbidity and active neuroinflammation. Furthermore, CA MS patients from Rio de Janeiro City showing increased ethnic admixture, presented mild inflammation. In conclusion, this study indicates that genetic and epigenetic influences are capable of modulating neuroinflammation and thereby morbidity and temporal progression of the disease in certain population groups.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Características Gerais da Esclerose Múltipla

Há mais de 100 anos Charcot, Carswell e Cruveilhier descreveram as características clínicas e patológicas da Esclerose Múltipla (EM), uma doença inflamatória desmielinizante que afeta o sistema nervoso central (SNC). Pacientes com EM apresentam seqüelas neurológicas graves com déficit substancial de funções sensitivas, motoras, autonômicas e neurocognitivas. Essas disfunções temporárias e/ou cumulativas podem resultar da combinação de (1) inflamação com edema; (2) ciclos de desmielinização e remielinização; (3) perda axonal; (4) efeito agudo de citocinas na condução axonal; (5) efeito citotóxico de citocinas, quimiocinas e enzimas proteolíticas; (6) perda de oligodendrócitos e (7) morte neuronal. A doença manifesta-se com uma série de surtos alternados pelos períodos de remissão parcial ou completa, muitas vezes seguidos de uma fase de progressão crônica (Prat & Antel, 2005; Bruck & Stadelmann, 2005; Hafler et al., 2005). Os surtos tipicamente consistem de um sintoma e/ou combinação de sintomas sensoriais, neurite óptica, deficiência na marcha, sintomas do tronco cerebral (diplopia e ataxia), sintoma de Uhthoff (piora sintomática com o aumento da temperatura corpórea) e disfunção do esfíncter (Wingerchuk et al, 2001). A integração de critérios clínicos, laboratoriais do líquido (LCR) e imagem de ressonância nuclear magnética (RNM) definem o diagnóstico de EM mesmo na ausência de um marcador biológico específico (Bruck & Stadelmann, 2005; Hauser, 2005).

EM afeta aproximadamente 1 milhão de pessoas em todo o mundo sendo a sua maior prevalência nos países de clima frio e temperado (0,1% da população), somente nos Estados Unidos o número de indivíduos doentes varia de 250.000 a 350.000 (Dyment et al., 2004; Bates & Ebers, 2003). Aqui no Brasil, a doença era considerada rara. No entanto, dados recentes mostram incidência elevada inclusive nos indivíduos de etnia negra que em

outros países são raramente afetados (Rivera, 2005; Bates & Ebers, 2003; Callegaro et al., 2001; Papais-Alvarenga et al., 2002). Acredita-se que essa maior incidência em afro-descendentes encontrada aqui no Brasil ocorra pela grande miscigenação do povo brasileiro (Caballero et al., 1999).

Como outras doenças de natureza autoimune, EM também afeta mais as mulheres do que homens (Czlonkowska et al., 2005; van den Broek et al., 2005). Embora a doença possa iniciar em qualquer idade, observa-se uma maior incidência em jovens adultos na faixa etária de 20 a 40 anos, considerada idade economicamente ativa. EM apresenta formas clínicas variadas, sendo as principais: surto-remissiva (SR), progressiva secundária (PS) e progressiva primária (PP) (Al-Omaishi, 1999; Sorensen, 2005; Sospedra & Martin, 2005; Lublin, 2005). A forma SR acomete cerca de 85% dos pacientes, sendo caracterizada por sintomas e sinais neurológicos que se mantêm durante alguns dias, seguido de melhora do quadro clínico. Um percentual elevado (50%) dos pacientes SR evolui após alguns anos para forma progressiva secundária, que se caracteriza com remissões muito brandas, geralmente imperceptíveis. Aproximadamente 10% dos pacientes apresentam a forma progressiva primária desde o início da doença.

O quadro clínico observado nos pacientes é consequência direta das lesões inflamatórias no SNC. A desmielinização, que é caracterizada pela destruição da bainha de mielina, produz uma alteração da condução saltatória dos impulsos nervosos, determinando inibição de 5 a 10% da propagação elétrica normal e bloqueios permanentes da condução elétrica (Scolding, 1998). Além disso, edema e produtos da resposta inflamatória, como citocinas e quimiocinas, liberados localmente pelas células ativadas, também são capazes

de alterar a funcionalidade dos axônios, reduzindo a condução dos impulsos nervosos (Smith, 2001).

A descrição da EM por Charcot em 1868; as observações de Louis Pasteur nos coelhos com encefalomielite pós-vacinal aguda e de Rivers em 1933, quando primatas saudáveis desenvolviam uma doença similar a EM após injeção de homogenato de cérebro, serviram de base para proposição da natureza imune da EM. Estudos em roedores mostraram (Pettinelli et al., 1981; Prat & Antel, 2005) que a inoculação de componentes da mielina com adjuvantes causava encefalomielite (EAE) aguda, crônica ou surto-remissiva. Além disso, a observação que EAE poderia ser induzida em animais não imunes pela transferência de células T CD4⁺ específicas para mielina (Pettinelli et al., 1981) e não com anticorpos, levou à conclusão que a EM seria uma doença autoimune mediada principalmente pelo linfócito CD4⁺ do tipo Th1. Contudo trabalhos recentes mostram a importância dos linfócitos B e sua participação na fisiopatologia da lesão (Uccelli et al., 2005; Villar et al., 2005; Scolding, 2005; Reindl et al., 1999).

A alteração na integridade da Barreira-Hematoencefálica (BHE) e migração de leucócitos para dentro do SNC são eventos iniciais na patogenia das doenças inflamatórias do SNC. Adesão e migração de linfócitos pela parede do endotélio até os locais de inflamação são eventos complexos que dependem da produção de citocinas inflamatórias e quimiocinas, favorecendo a interação dos leucócitos via moléculas de adesão ICAM-1 (molécula de adesão intercelular), VCAM-1 (molécula de adesão celular vascular) e E-selectinas presentes nas células endoteliais e os seus respectivos ligantes LFA-1 e VLA-4 expressos nos leucócitos (Greenwood et al., 2002; Veldhuis et al., 2003; Ransohoff et al., 2003). Além disso, as metaloproteinases (MMP) gelatinases A e B, também conhecidas

como MMP-2 e MMP-9 cuja produção é influenciada por diferentes tipos celulares (macrófagos, linfócitos, fibroblastos) e citocinas favorecem a migração de células inflamatórias pela BHE (Abraham et al., 2005).

1.2 Etiopatogenia da EM

EM parece não ter um agente patogênico específico ou ainda é desconhecido, contudo dados epidemiológicos suportam a hipótese de etiologia multifatorial (Sadovnick et al., 1996; Kantarci et al., 2002), com a participação de fatores exógenos aliados a uma predisposição determinada geneticamente (Ebers et al., 1995; Holmes et al., 2005), e fatores epigenéticos também considerados importantes na etiopatogenia da EM (Steinman et al., 1994). Associação desses fatores determinaria reatividade imunológica e/ou alteração na homeostasia das citocinas, desencadeando os eventos celulares e moleculares relacionados com os processos inflamatórios e desmielinizantes do SNC. Estudos genéticos de agregação familiar; indicam uma maior prevalência em gêmeos monozigóticos (31%) do que dizigóticos (5%), uma relativa suscetibilidade e/ou proteção étnica; e possível associação com alelos do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), principalmente genes do cromossoma 6p21 (Holmes et al., 2005; Dyment et al., 2004).

1.2.1 Influências genéticas na EM

Os genes associados ao sistema HLA estão localizados no braço curto do cromossomo 6 humano (locus 6p21.3) ocupando um segmento equivalente a 3.500 kb do DNA. As moléculas de HLA estão agrupadas em três classes de acordo com sua estrutura e função. O complexo HLA é um sistema altamente polimórfico e poligênico com vários genes codominantes e muitos alelos para cada locus. As moléculas HLA da classe II são constituídas de duas cadeias polipeptídicas expressas de forma constitutiva e/ou induzida em tipos celulares, que passam a exercer função acessória como apresentadora de antígeno (APC); enquanto as moléculas da classe I são expressas de forma ubíqua nas células nucleadas. Nos humanos, a região do HLA da classe II inclui as sub-regiões DP, DQ, DR, cada qual possui genes A e B, que codificam respectivamente as cadeias α e β da classe II. O MHC é uma proteína da membrana celular, cuja principal função é a interação com seqüências de peptídeos (antígeno) formando o complexo MHC-antígeno, capaz de interagir seletivamente com células T CD8 e CD4.

A maioria dos genes localizados no complexo HLA codifica moléculas que apresentam grande polimorfismo porém baixa freqüência de recombinação. As moléculas HLA classe I e II são importantes porque influenciam a formação do repertório de células T e o padrão de reatividade imunológica. Como a maior parte dos genes do complexo HLA são altamente polimórficos, as variantes dos seus alelos são candidatos em potencial na associação com susceptibilidade e proteção às doenças (Zipp et al., 2000). Contudo a susceptibilidade para EM é provavelmente determinada pela interação de vários genes e isto tem levado a inúmeros estudos com o objetivo de estabelecer loci específicos implicados na susceptibilidade à EM e/ou regulando a resposta imune e codificando proteínas estruturais da mielina (Kellar-Wood et al., 1995; Pouly et al., 1999). Os genes

associados com o haplótipo DR15 incluem membros da família do fator de transformação do crescimento (TGF)- β , antígeno associado a linfócito T citotóxico (CTLA-4), complexo associado ao fator de necrose tumoral (TNF), antagonista do receptor IL-1 e receptor de estrogênio. Outros genes que podem conferir risco têm sido reportados (Sellebjerg et al., 2000, Kantarci et al., 2005; Ligers et al., 1999; Suppiah et al., 2005). Estudos de polimorfismos de genes de quimiocinas (CCR2; CCR5), citocinas e receptores IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL4RA, TNF α e TNFR, IL-10 e IL-10RA, TCR, Fas-1, vitamina D e receptor de estrogênio mostram tanto efeito protetor ou indutor de suscetibilidade [Coyle, 2005; Vandebroek & Goris 2003]. Os resultados controversos dos estudos de polimorfismo mostram a necessidade de padronização das metodologias além de estudos mais amplos considerando a etnia e com amostragem muito maior de pacientes e controles [Alloza et al., 2002; Vandebroek et al., 2003; Ehling et al., 2004; Dymment et al., 2004; Fukazawa et al., 2005; Wergeland et al., 2005; Matesanz et al., 2001).

A distribuição da EM não pode ser explicada somente pela genética populacional. O fato de mulheres serem mais acometidas do que homens em uma razão de 2:1 (Coyle, 2005), as evidências da piora clínica durante o ciclo menstrual/ menstruação; a correlação entre o aumento de estradiol e baixa de progesterona com o aumento da atividade da doença; diminuição dos surtos durante a gravidez e o efeito terapêutico do estriol em pacientes SR sugere variações hormonais como fator de risco [Alloza et al., 2002; Czlonkowska et al., 2005; Kantarci et al., 2005; Ferrero et al., 2004; Soldan et al., 2003]. O mecanismo preciso da influência de hormônios sexuais na susceptibilidade da EM não é conhecido, mas deve-se em parte ao efeito de estrogênios estimulando a secreção de citocinas pró-inflamatórias (Vandebroek et al., 2003).

1.2.2 Influências Ambientais na Patogenia da EM

A distribuição geográfica da EM parece também refletir o nível econômico de um país. A prevalência da doença parece aumentar com o desenvolvimento sócio-econômico, observando-se uma associação estreita com a industrialização, poluição, exposição a solventes, mudanças na dieta, hábito de tabagismo. Além disso, o atraso ou redução na exposição a infecções na primeira infância em países desenvolvidos levou à formulação da “hipótese higiênica” (Vercelli, 2004; Bach, 2002). Essa hipótese tem por base estudos e observações de doenças inflamatórias autoimunes : diabetes tipo 1 e EAE. Postula-se que um atraso na exposição ou redução nas infecções durante a infância determina propensão aumentada ao desenvolvimento de doenças autoimunes mediadas pelas células Th1 e ou Th2 como na atopia, asma ou alergia (Vercelli, 2004) (Figura 1).

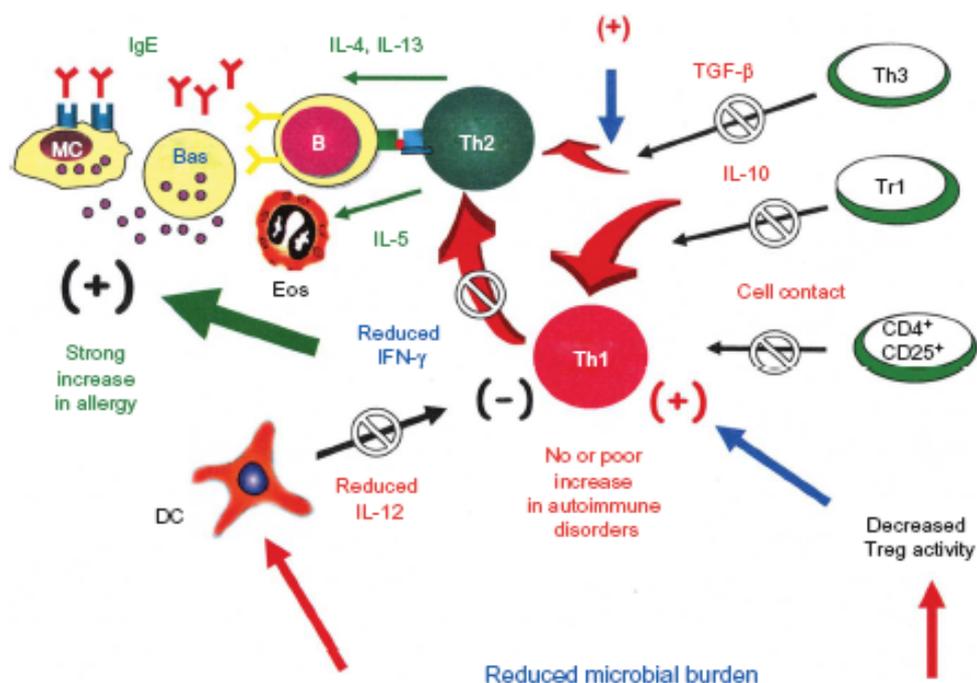


Figura 1. Modelo da Hipótese Higiênica (Vercelli et al, 2004).

A exposição a uma carga antigênica alta, que ocorre nas infecções virais e bacterianas, funciona tanto como desencadeador como na manutenção da doença (Sibley et al, 1985). O padrão temporal e repentino aumento na incidência da doença, em uma comunidade isolada (Kurtzke, 1983) também são indícios de agentes infecciosos relacionados com a doença. A etiologia viral de inúmeras doenças desmielinizantes (leucoencefalopatia multifocal progressiva, encefalite pós-infecciosa) explica o interesse nas viroses como desencadeadoras da EM [Gutierrez et al., 2002; Gildden, 2005; Derfuss et al., 2005; Christensen, 2005]. A dificuldade em identificar um único microorganismo como causador da EM provavelmente indica que o paradigma “um organismo, uma doença” não se aplica a doenças complexas multifatoriais. Os principais mecanismos propostos indicando como infecções podem induzir EM são: (i) mimetismo molecular devido a ativação de células autoreativas pela reação cruzada entre antígenos próprios e agentes estranhos (Davies et al., 2005); e (ii) ativação assistente, na qual células autoreativas são ativadas por causa de eventos inflamatórios não específicos que ocorrem durante a infecção (Holmoy et al., 2005). Uma terceira proposta seria que a infecção induz a doença através da combinação desses dois mecanismos. O mimetismo molecular envolve a reatividade de células T e B tanto à peptídeos ou determinantes antigênicos oriundos do agente infeccioso ou próprio alterado. O reconhecimento de antígenos próprios em um nível intermediário de afinidade pelas células T durante a seleção intratímica, leva à seleção positiva e exportação dessas células para periferia. A reação cruzada dessas potenciais células T reativas ao

próprio com antígenos estranhos pode levar à ativação durante a infecção, migração para o SNC e, eventualmente, uma doença autoimune com danos teciduais (Bar-Or, 2005).

O mecanismo da ativação assistente pode ser classificado em duas categorias. A primeira enfoca a ativação de células T autoreativas por citocinas inflamatórias, superantígenos e reconhecimento de padrão molecular pela ativação do receptor do tipo Toll (TLR). A segunda, envolve a exposição de antígenos hospedeiros e o efeito adjuvante de agentes infecciosos nas APCs. Algumas citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas produzidas durante a infecção são consideradas as principais ativadoras de células T CD8+ vírus-específica e indutoras de processos autoimunes (Franciotta & Lolli, 2005). Embora a administração de citocinas possa induzir os surtos, existem poucos exemplos no qual a produção local aumentada de citocinas e quimiocinas inflamatórias poderia quebrar a tolerância em animais saudáveis (Waldner et al., 2004).

Outro mecanismo de ativação assistente que depende do reconhecimento de TCR específico é a exposição de antígenos do hospedeiro como consequência de danos teciduais. A apresentação de autoantígenos associada com efeitos adjuvantes de agentes infecciosos pode resultar na ativação de novas células T autoreativas e posterior propagação/expansão de antígenos (REGA). A expansão da resposta de células T pode incluir a apresentação de epítomos que normalmente não seriam processados ou apresentados como epítomos imunodominantes. O reconhecimento do epítomo críptico é mais importante durante a progressão e perpetuação da resposta autoimune (Davies et al., 2005).

1.3 Principais Antígenos encefalitogênicos do SNC

A proteína básica da mielina (MBP) é depois do proteolipídio PLP, a mais abundante proteína da mielina, representando aproximadamente 30 a 40% das proteínas totais da mielina. Em mamíferos, existem cinco isoformas que variam no peso molecular (14 a 21,5 kDa), resultantes da clivagem diferencial de 11 exons no locus Golli-MBP (Seamons et al., 2003). A isoforma mais pesada envolvida na manutenção da estrutura da mielina, está posicionada na superfície intracelular da bainha de mielina, interagindo via pontes de hidrogênio com grupamentos lipídicos. A isoforma 18,5 kDa é a mais abundante e tem sido usada na maioria dos estudos imunológicos. Diferente do PLP e MOG, a MBP é encontrada em quantidade significativa no sistema nervoso periférico e central. Algumas seqüências estão associadas com a patogenia da EM em grupos de pacientes com a mesma expressão alélica do MHC classe II (Fernandez et al., 2004; Warren et al., 1995; Carvalho et al., 2003; Lutterotti et al., 2002).

MBP é considerada como antígeno candidato envolvido na fisiopatologia da EM. Contudo estudos em animais com EAE, indicam que certos epítomos são mais encefalitogênicos que outros. Essas proteínas são muito imunogênicas, podendo-se detectar nos fluidos biológicos (soro, líquido) a produção clonal de anticorpos para esses epítomos em decorrência da ativação da resposta imune. A produção desses anticorpos pode inclusive desencadear ativação local do sistema complemento, alterações inflamatórias e desmielinização no SNC (Carvalho et al., 2003; Kieseier et al., 1999; Berger et al., 2003; Haase et al., 2001).

PLP é a proteína (~30 kDa) mais abundante da mielina do SNC (cerca de 50%), altamente hidrofóbica e conservada entre as espécies. Outra proteína, a DM-20 (20 kDa)

também codificada pelo gene PLP é gerada pela quebra alternativa, resultando na perda de 20 aminoácidos. Durante a mielinogênese, a expressão de DM-20 é elevada, porém durante o desenvolvimento de oligodendrócitos, PLP/DM-20 localiza-se principalmente na região perinuclear do Golgi e na membrana plasmática (Kramer et al, 2001). A sua localização na região mais externa da bainha de mielina, indica um potencial mais encefalitogênico do que a própria MBP, pois seus sítios de ativação estão mais expostos (Schmidt, 1999). A seqüência humana 95-116 do PLP é considerada como um forte indutor de susceptibilidade à resposta inflamatória autoimune na EM, e seu reconhecimento está associado com o alelo DRB1*1501 (Krogsgaard et al., 2000). A glicoproteína associada à mielina (MAG) representa cerca de 1% das proteínas totais, sendo expressa na mielina do sistema nervoso central e periférico. MAG existe em duas isoformas, L-MAG presente durante a mielinização e a S-MAG expressa predominantemente na mielina madura. Essa glicoproteína é bastante susceptível a proteólise, resultando na forma de transição dMAG com peso molecular 90 kDa (Schmidt, 1999). MAG, localizada na membrana periaxonal, está envolvida especificamente na interação glia-axônio (Kramer et al., 2001).

A glicoproteína associada ao oligodendrócito (MOG), um componente específico do SNC, representa 0,01% a 0,05% das proteínas da mielina. Está localizada nos corpos celulares e processos dos oligodendrócitos e na camada externa da bainha de mielina (Figura 2). A expressão de dois domínios transmembranares na superfície externa da mielina e membrana plasmática dos oligodendrócitos é um possível antígeno-alvo. Entre os antígenos não específicos da mielina estão incluídos a proteína S100b e proteína glial fibrilar ácida (GFAP) presente em astrócitos, embora o potencial encefalitogênico da

resposta autoimune ainda seja obscuro (Rosbo & Bem-Num, 1998). Além desses, podemos citar glicoproteínas específicas ao oligodendrócitos (OSP) e $\alpha\beta$ cristalina ($\alpha\beta$ -C).

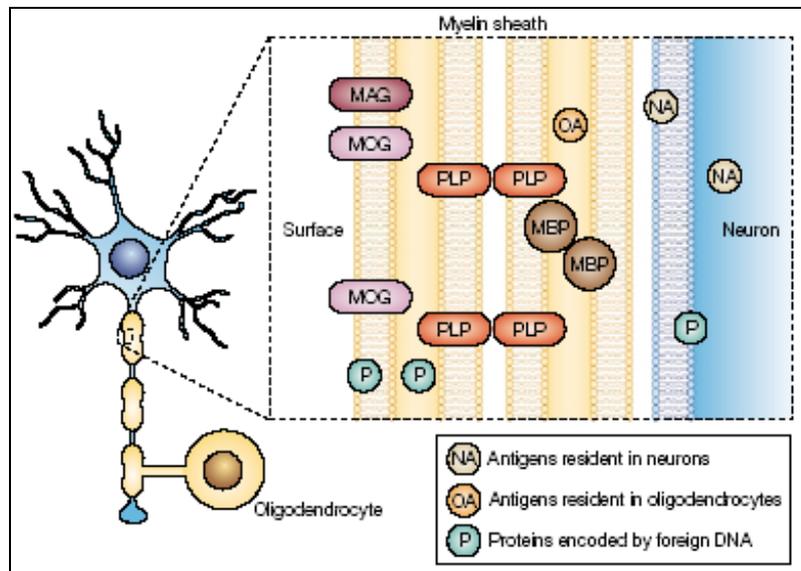


Figura 2. Composição lipoprotéica da bainha de mielina (Hemmer, et al, 2002).

1.4 Papel dos Linfócitos B na Fisiopatologia da EM

Bornstein e colaboradores (1959) mostraram que fatores humorais também poderiam ter um papel relevante na desmielinização inflamatória devido a atividade desmielinizante de imunoglobulinas (Igs) específicas anti-mielina presente no soro. Estudos histológicos do SNC e análise do líquido cefalorraquidiano (LCR) mostraram linfócitos B, plasmócitos e anticorpos específicos para mielina nas áreas de desmielinização em pacientes com EM (Genain et al., 1999). Desde então foi sugerido que os anticorpos podem causar desmielinização pela opsonização da mielina e ativação da fagocitose (van der Laan et al., 1996). Um outro mecanismo de desmielinização mediado por anticorpo age via

ativação de componentes do sistema complemento, levando a deposição do complexo de ataque a membrana e citólise mediada por complemento (Mead et al., 2002).

A observação que as imunoglobulinas estão elevadas no LCR de pacientes com EM tem sido a mais importante evidência indicando o papel das células B e anticorpos na fisiopatologia da EM. A correlação entre o aumento de imunoglobulinas no LCR com episódios de piora sugere o envolvimento da resposta imune humoral na EM [Berger & Reindl, 2000; Egg et al., 2001; Bar-Or, 2005; Lutterotti et al., 2002; Angelucci et al., 2005; Davies et al., 2005; Villar et al., 2005). As Igs presentes no LCR de pacientes com EM mostram uma distribuição oligoclonal, ou seja, apenas um número limitado de clones de células B contribui para o aumento da produção de Igs (Egg et al., 2001; Walsh et al., 1986; Sharief et al., 1991). As células B e anticorpos podem contribuir para patogênese da EM de maneiras diversas: (i) servindo como APCs para células T autoreativas (Wang et al., 1997, Wucherpfennig, 1997; Villar et al, 2005); (ii) fornecendo sinal de co-estimulação para células T autoreativas; (iii) recrutando células T autoreativas para o SNC (Lou et al, 2000); (iv) amplificando ativação das células T idiotipo-específicas que estimulam ativação de células B a produzirem mais anticorpo com idiotipo característico (Holmoy et al., 2003); (v) contribuindo para manutenção da inflamação e desmielinização. Além disso, anticorpos IgM contra certos antígenos do SNC aumentam a remielinização em diferentes modelos animais da EM (Rodriguez & Lennon,1990).

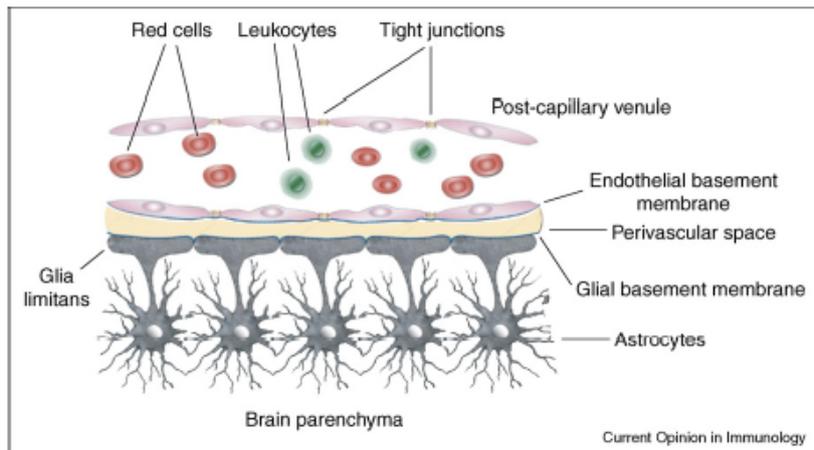
Anticorpos anti-MOG são capazes de causar destruição da mielina na EAE (Schluesener et al., 1987; Linington et al., 1988; Storch et al., 1998; Litzemberger et al., 1998), talvez pela sua localização mais externa na mielina, em contraste aos anticorpos anti-MBP e -PLP (Genain et al., 1995). Anticorpos anti-MOG também tem sido

encontrados em lesões de EM (Genain et al., 1999), mostrando que a resposta das células B ao MOG está aumentada (Schluesener et al., 1987; Sun et al., 1991). Trabalhos recentes inclusive utilizam os níveis séricos de anticorpos anti-MOG em pacientes com primeiros sintomas de EM e lesões desmielinizantes na RMN, como indicador de exacerbações (Berger et al., 2003). Os anticorpos também podem desempenhar um papel benéfico: (i) desviando as citocinas para o padrão Th2; (ii) estimulando o reparo da mielina. Anticorpos IgM contra certos antígenos do SNC aumentam a remielinização em diferentes modelos animais (Rodriguez et al., 1990).

1.5 Neuroinflamação

A homeostasia do SNC é de fundamental importância para as propriedades de funcionamento das células neuronais. A observação do pesquisador Peter Medawar que o cérebro não rejeitava aloenxerto (Noseworthy, et al, 2000) foi seguida por achados complementares indicando ausência de células apresentadoras de antígenos (células dendríticas); a não expressão de MHC I e MHC II nas células do parênquima cerebral e ausência de drenagem linfática definida e estruturas linfóides no SNC. Em conjunto esses dados levaram à concepção que o SNC representava um sítio com privilégio imunológico. Também, a existência de um sistema de barreiras, a hematoencefálica (Figura 3a) e epitélio fluido-cérebro-espinhal (Figura 3b).

a)



b)

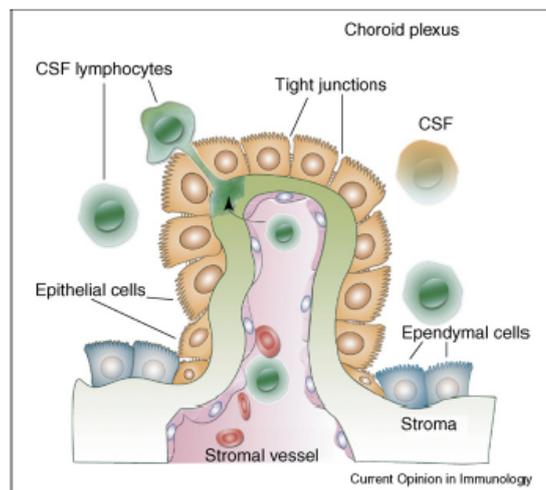


Figura 3. (a) Barreira hematoencefálica. (b) Barreira do FCS (Rebenko-Moll et al, 2006).

O termo “privilégio imune” foi interpretado para indicar a completa ausência da sobrevivência de células imunológicas no SNC. Atualmente, existe um novo conceito para o SNC devido à observação de: rejeição eventual de transplantes de tecido; reação de hipersensibilidade do tipo tardia no SNC; autoimunidade, como é o caso da EAE. No entanto, as reações inflamatórias do CNS são modificadas. É muito mais apropriado considerar o SNC com um órgão “especializado imunologicamente”. Existe uma variedade de condições patológicas no SNC, como infecções virais, isquemia ou doenças

inflamatórias (como é o caso da EM) aonde leucócitos atravessam a BHE, acumulam-se no espaço perivascular e muitas células encontram seu caminho para o parênquima cerebral. Dependendo do estímulo inflamatório e da região do SNC afetada, as vias moleculares para entrada de leucócitos no SNC são diferentes. Já existe um certo conhecimento sobre os sinais moleculares envolvidos na migração de linfócitos T antígeno específico com atividade neurocitotóxica. Inoculação endovenosa periférica de linfócitos encefalitogênicos em hospedeiros singênicos saudáveis ou imunização subcutânea com antígenos da mielina em adjuvante completo de Freund causam a EAE.

A BHE tem sido considerada o ponto mais claro de entrada de células imunes no SNC. Esse termo foi inicialmente descrito pela ausência de difusão passiva de moléculas pelos capilares do SNC. A BHE é formada por células endoteliais altamente especializadas, as quais inibem o tráfego transcelular de moléculas, pela baixa atividade de pinocitose e difusão restrita paracelular de moléculas hidrofílicas por causa da rede elaborada de junções de oclusão inter-endotelial complexa (Fox et al, 2000). As fenestrações intercelulares (Oksenberg et al, 2001) permitem o livre movimento de moléculas pelos vasos do plexo coróide e dos órgãos circumventriculares e a passagem de linfócitos T não ativados no tecido normal indica existência de mecanismos de imuno sobrevivência (Figura 4).



Figura 4. Entrada de células T CD4+ específicas para proteína básica da mielina para o SNC durante a indução de EAE (Boulanger et al, 2004).

1.6 Importância das Citocinas na EM

Citocinas são componentes críticos do processo inflamatório estando implicadas na morte de oligodendrócitos, degeneração axonal (Wugek et al, 2002; Bjartmar et al, 2003), disfunção neuronal (Lucchinetti et al, 2000) e na patogênese da neuroinflamação (Brosnan et al. 1995) (Comabella et al, 1998; Balashov et al, 2000; Kami et al, 2002). Estudos no modelo experimental (EAE) indicam que citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão levam ao recrutamento de leucócitos da periferia para o SNC via barreira hematoencefálica. Desse modo seria criado um ambiente inflamatório apropriado, onde células T CD4+ poderiam se diferenciar em Th1 e Th2 dependendo do microambiente. Células Th1 produzem IFN-gama, TNF-alfa, IL-2 e baixos níveis de IL-10, enquanto células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-13 e altos níveis de IL-10 (Abbas et al., 1996) (Figura 5).

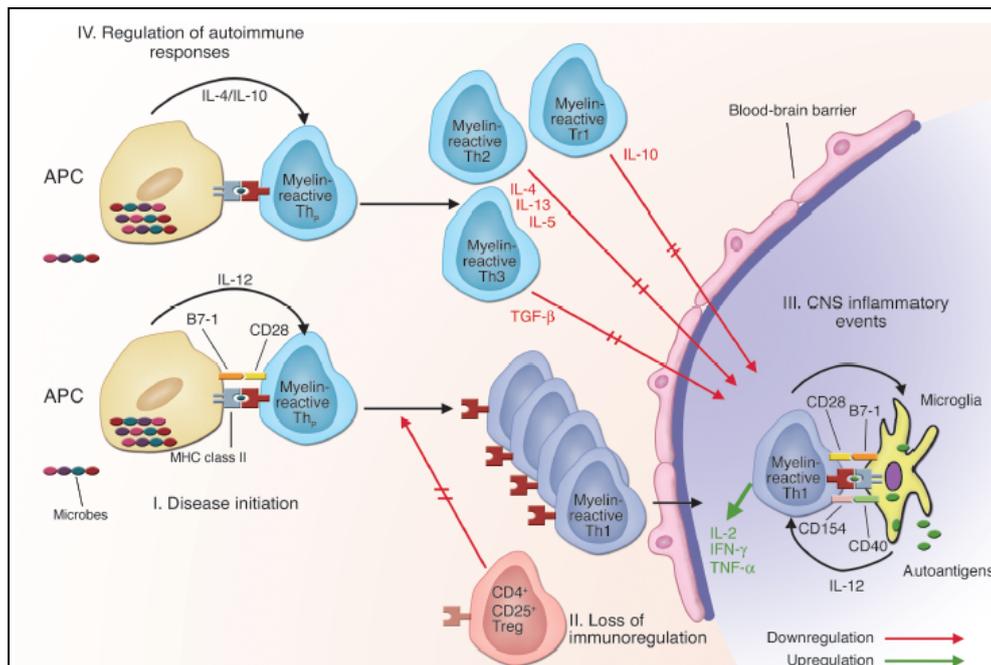


Figura 5. Hipótese da patogênese da Esclerose Múltipla (Hafler, 2004).

IFN-gama é produzido por células T e células NK. Suas funções incluem ativação de células mononucleares, diferenciação de células para o fenótipo Th1, indução da expressão de MHC-I e MHC-II, mudança de classe (isotipo) em células B e apoptose de células T e outros tipos celulares (Issazadeah et al, 1995, Issazadeah et al., 1998; Begolka & Miller, 1998). Estudos usando camundongos nocaute para IFN-gama mostraram que eram susceptíveis a EAE e apresentavam intenso infiltrado inflamatório no SNC (Feber et al, 1996). O aparente paradoxo pode ser explicado por uma função regulatória do IFN-gama como uma citocina anti-célula T proliferativa (Konieczny et al, 1998; Hassan et al, 1999; Badovinac, 2000).

TNF-alfa é uma proteína solúvel de 17 kDa composta por três subunidades idênticas, produzida principalmente por células mononucleares fagocíticas ativadas, células NK, células B, células T ativadas e no SNC por astrócitos e microglia. A produção de TNF-alfa está associada com resposta do tipo Th1, que induz ativação de uma variedade de tipos celulares e expressão de moléculas de adesão, quimiocinas e citocinas. TNF-alfa tem um efeito direto na indução de apoptose de oligodendrócitos e desmielinização (Selmaj, 2000; Probert et al, 1995).

IL-4 é produzida pelas células Th2 CD4+ e participa na diferenciação e crescimento de células B. IL-4 inibe *in vitro* a ativação de células Th1, diminuindo a produção de IL-1 e TNF-alfa. IL-4 amplifica a resposta Th2 através da ativação do seu receptor em células T, resultando na ativação de fatores intracelulares, STAT6, que induzem a transcrição de genes relacionados com resposta Th2.

1.7 Importância das Gelatinases e Quimiocinas na EM

Quimiocinas são potentes citocinas com atividade quimiotática produzidas localmente nos mais diversos tecidos, promovendo pela interação com seu receptor na superfície celular o direcionamento na migração e a chegada de leucócitos e outras células, inclusive progenitores neurais (Foxman et al., 1997; Belmadani et al, 2006) para o sítio inflamatório (McQuibban et al, 2002). Os sinais quimiotáticos que ativam as integrinas dos leucócitos resultando na ligação de alta afinidade ao endotélio e subsequente migração ao tecido inflamado, são transmitidas por receptores associados à proteína G, os quais são expressos na superfície de leucócitos (Murphy et al, 1994).

As quimiocinas são classificadas de acordo com a posição dos dois primeiros resíduos conservados de cisteína na sua porção N-terminal e o número de aminoácidos entre elas. Atualmente, 4 (quatro) famílias de quimiocinas são descritas C, CC, CXC e CX₃C com mais de 54 moléculas dessa classe conhecidas em humanos (Pease et al, 2006). Algumas quimiocinas estão envolvidas no recrutamento de células inflamatórias para o SNC. A CCL2 (ou MCP-1) recruta células do sistema imunológico para locais de trauma, infecções bacterianas, exposição a toxinas e isquemia. As proteínas quimiotáticas de monócitos/macrófagos (MCPs) da família CC em humanos compreendem atualmente quatro proteínas: MCP-1 (CCL2), MCP-2 (CCL8), MCP-3 (CCL7) e MCP-4 (CCL13) com efeito quimiotático para sub-tipos de leucócitos monócitos, basófilos, eosinófilos, células dendríticas e citotóxica natural (NK) (Bacon et al, 2002; Izikson et al, 2002). Essas moléculas também estão envolvidas nas doenças inflamatórias crônicas e autoimunes,

inclusive a EM, onde a expressão das MCPs e a chegada de leucócitos acompanham a evolução da doença (Luster 1998; Simpson et al, 1998; Tanuma et al, 2006). Essa quimiocina é essencial no desenvolvimento da EAE crônica (Karpus et al, 1995; Karpus et al, 1997).

A molécula MCP-1 (CCL2) é uma das principais proteínas quimioatrativas de monócitos, porém os mecanismos de ação nessas células não estão totalmente esclarecidos (Arefieva et al, 2005). Sabe-se que atuando via ligação com o receptor CCR2 pode estimular a produção de citocinas em macrófagos e promover migração via aderência mediada por integrinas, polarização e proliferação celular (Reape et al, 1999). Os receptores das quimiocinas apresentam uma certa promiscuidade, pois um mesmo receptor reconhece e ativa-se pela ligação com variados tipos de quimiocinas e diferentes quimiocinas ligam-se a diferentes receptores. Esses receptores, assim como os da família MCP apresentam-se com sete domínios transmembranares associados à proteína G (Thelen et al, 2001).

As quimiocinas são mediadores pró-inflamatórios envolvidos no direcionamento seletivo dos leucócitos para o interior do parênquima cerebral. A sua ausência em animais transgênicos (ausentes de CCL2 ou CCR2) causou a redução de monócitos nos focos de lesão intracerebral e também da severidade da EAE. Também nos pacientes com neuroinflamação, níveis menores de MCP-1 indicam melhor prognóstico (Iarlori et al, 2002). CCL2 é altamente expressa no espaço perivascular e no parênquima cerebral durante a inflamação no SNC, contudo ela também está presente no LCR em níveis elevados em variados processos inflamatórios (infarto, meningite e esclerose múltipla) (Stamatovic et al, 2006; Dimitrijevic et al, 2006).

O receptor de CCL2 (CCR2) está presente em componentes da BHE (astrócitos e células endoteliais) e células do próprio SNC sugerindo que esta molécula participe não apenas no recrutamento de células, mas também modulando o processo inflamatório e a alteração na permeabilidade da BHE (Figura 6) (Andjelkovic et al, 1999; Tanuma et al, 2006). O efeito da CCL2 na seletividade da BHE pode ser direto, atuando assim nas células endoteliais do cérebro, reduzindo a expressão de proteínas de junção oclusiva (occludina, ZO-1, ZO-2 e claudina-5) (Stamatovic et al, 2003; Stamatovic et al, 2005), ou indiretamente induzindo a expressão de outras moléculas inflamatórias pelas próprias células endoteliais, astrócitos e leucócitos.

As características da inflamação no SNC são distintas daquelas observadas em outros órgãos devido à presença da BHE que proporciona um isolamento parcial do SNC de elementos celulares e moleculares circulantes do sistema imune (Glabinski et al, 2002). Além da participação das citocinas e quimiocinas, temos ainda a presença de enzimas proteolíticas capazes de degradar a membrana basal e a matriz extracelular (ECM) (Veldhuis et al., 2003) no processo de transmigração das células ativadas para o sistema nervoso central.

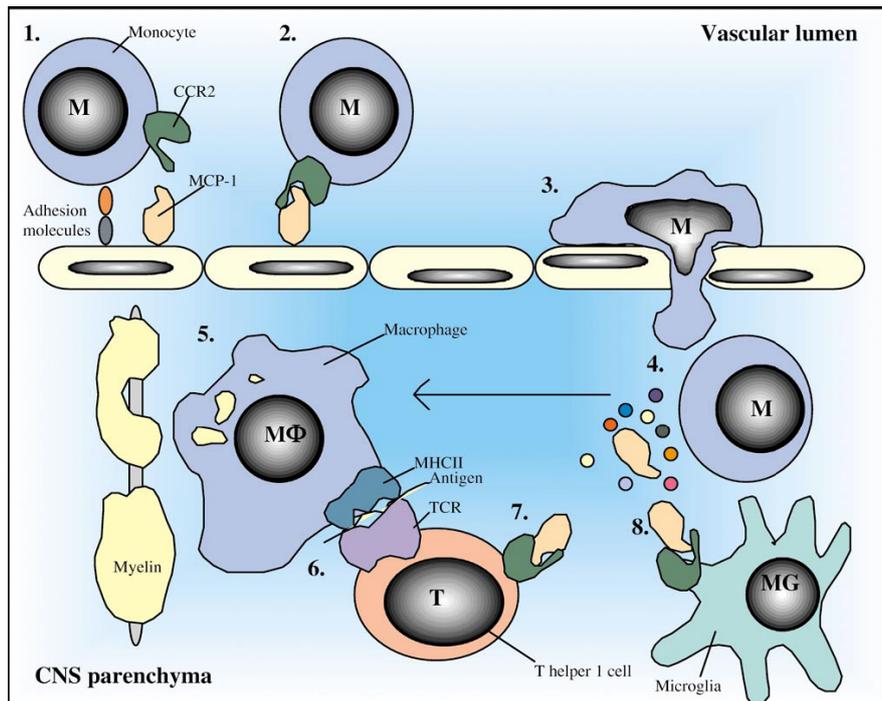


Figura 6. Esquema demonstrando a atividade quimiotática da CCL 2 direcionando os monócitos/macrófagos para dentro do SNC. (Izkison et al, 2002)

Os membros da família das metaloproteinasas (MMPs) estão distribuídos em subgrupos dependendo da sua estrutura e especificidade do substrato. As gelatinases MMP-2 e MMP-9, são capazes de degradar os componentes da ECM como colágeno tipo IV, fibronectina e laminina (Bjorklund et al, 2005). As MMPs constituem uma família de endopeptidase zinco-dependentes, secretadas por vários tipos celulares (macrófagos, fibroblastos) capazes de degradar componentes do tecido conjuntivo e da membrana basal. Essas enzimas participam normalmente dos processos fisiológicos, como desenvolvimento fetal, angiogênese, remodelamento do tecido e no processo de migração de células inflamatórias (Lemaître & D'Armiento, 2006). Contudo, durante processos patológicos, como nas doenças inflamatórias de natureza autoimune, metástase de células cancerosas,

artrite, aneurisma, doenças inflamatórias, a produção aberrante de MMP causa degradação da matriz extracelular e amplificação da lesão tecidual (Rosenberg et al, 2004). Na EM, as MMPs mais envolvidas no processo de migração pela BHE são as gelatinases A e B, também conhecidas como MMP-2 e MMP-9, respectivamente. Essas enzimas podem estar envolvidas no processo da desmielinização pela degradação de proteínas da mielina (Chandler et al, 1995; Gijbels et al, 1993; Proost et al, 1993), da matriz extracelular e da membrana basal da BHE (Rosenberg et al, 1992). As MMPs facilitam a infiltração das células imunes no parênquima cerebral (Leppert et al, 1995); a ação de citocinas pró-inflamatórias associadas a membrana, como a clivagem do TNF-alfa da superfície celular (Hartung et al, 1992; Black et al, 1997) amplificando sua atividade mielinotóxica (Proost et al, 1993).

A expressão e atividade das MMPs são reguladas tanto em nível de transcrição pelas citocinas (Biddison et al, 1997; Cross et al, 1990; Cross et al, 1999; Xie et al, 1994; Zhou et al, 1993) e fatores de crescimento e a nível pós-transcrição, pela secreção de enzimas latentes (pré-pró-MMP) e ativação de zimogênios (pró-MMP) por integrinas e proteases presentes no meio extracelular e associada à membrana celular (MT-MMP). Existe um balanço delicado entre a produção endógena de inibidores teciduais – TIMPs e a produção de MMP no microambiente, determinando a remodelagem fisiológica ou destruição patológica do tecido (Rosenberg et al, 2004). Inibidores não específicos como alfa1-antitripsina e alfa2-macroglobulina também interferem com a atividade das MMPs.

1.8 Influência da etnia na EM

Africanos Americanos (AA) desenvolvem EM com menos frequência que os Caucasianos Americanos (CA) (Bailey, 1922; Alter, 1962; Oh & Calhoun 1969; Kurtzke et al, 1979). Estudos recentes mostraram que AA têm um risco relativo de 0,64 para desenvolver EM comparado com CA (Wallin et al, 2004). Isso se dá pelo fato dos AAs representarem a população variável com ancestrais Africanos e Caucasianos, sugerindo que a etnia africana pode ser responsável pela proteção parcial contra a EM. Além disso, EM parece ser rara em africanos pretos, com poucos casos documentados (Foster & Harries, 1970; Ames & Louw, 1977; Ames & Bowen, 1979; Kioy, 2001; Modi et al, 2001). Essa observação pode ser devida ou a resistência genética ou a prevalência de baixos fatores de risco ambiental.

Desse modo, o entendimento dos mecanismos de danos mediados por citocinas, quimiocinas e metaloproteinases é necessário para melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia da lesão na EM.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Determinar possíveis diferenças no processo inflamatório da Esclerose Múltipla entre populações distintas de Afro-descendentes (AB) e descendentes caucasianos (CA) da região sudeste Brasileira.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar os níveis séricos de imunoglobulinas reativas dos isotipos IgA e IgG específicas para os epítomos encefalitogênicos da mielina: o proteolipídio PLP e a seqüência MOG 92-106;
- Fazer uma análise comparativa da atividade das metaloproteinases -2 e -9 no soro de um grupo de pacientes EM da cidade do Rio de Janeiro e de pacientes EM da cidade de Ribeirão Preto com características étnicas homogêneas;
- Fazer uma análise comparativa dos níveis séricos das citocinas IFN-gama, IL-4 e TNF-alfa e da quimiocina CCL-2 no soro de um grupo de pacientes EM da cidade do Rio de Janeiro e de pacientes EM da cidade de Ribeirão Preto com características étnicas homogêneas;
- Analisar uma possível mudança no perfil inflamatório da doença, no grupo de pacientes AB e CA da cidade do Rio de Janeiro com diferentes tempos de evolução clínica da EM.

3 MATERIAL & MÉTODOS

A classificação por etnia considerou como afro-brasileiros pacientes com ancestrais pretos até a terceira geração e caucasianos pacientes que desconheciam na ancestralidade parentes afro-descendentes. O termo afro-brasileiro foi usado a partir do conceito antropológico proposto por Ribeiro (Ribeiro, 1995). Os pacientes foram classificados quanto à incapacidade neurológica pela escala de Kurtzke (Kurtzke, 1983). Todos os pacientes foram submetidos a exames complementares de tomografia computadorizada e ressonância nuclear magnética do cérebro e medula espinhal e no momento da coleta, não apresentavam sinais clínicos e/ou laboratoriais de processo infeccioso viral e/ou bacteriano.

O projeto foi aprovado pela comissão de ética da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e do Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) com registro nº 1265. Todos os pacientes assinaram termo de consentimento para participar da pesquisa de acordo com as normas da comissão de ética da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ.

3.1 Grupo de Estudo

A coorte era constituída por 99 pacientes com EM clinicamente definida pelos critérios de Poser (1983) e McDonald (2001). O grupo de 50 pacientes da cidade do Rio de Janeiro era acompanhado por neurologistas do Setor de Doenças Desmielinizantes Primárias do Sistema Nervoso Central do Serviço de Neurologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) da UFRJ. Entre estes, 25 eram afro-descendentes (AB) e 25 Caucásios (CA). Outro grupo de 49 pacientes EM, acompanhado por neurologistas do Hospital das Clínicas da USP (Ribeirão Preto) era uma população homogênea composta por indivíduos CA, todos mapeados com HLA DR2.

No grupo de pacientes EM do Rio de Janeiro (RJ), tanto os CA como os AB eram na maioria do sexo feminino (respectivamente, 60 e 56%) e no grupo da cidade de Ribeirão Preto (RP) a maioria (65,3%) era do sexo feminino. Quanto à evolução clínica, todos apresentavam a forma surto-remissiva (SR).

3.2 Amostras

O sangue periférico obtido por punção venosa foi coletado em tubo estéril sem anticoagulante contendo gel-soro (Becton & Dickson - BD, Brasil). Após retração do coágulo, o soro foi centrifugado a 200xg por 10 min em centrífuga clínica de bancada (Sorvall) e somente amostras lípidas livres de hemólise foram estocadas a -20°C em alíquotas de 100 μL até o momento do uso.

3.3 Dosagem de imunoglobulinas reativas para componentes da mielina

Como antígenos foram utilizados: proteína básica da mielina (MBP) de origem bovina (Sigma Chem. Co; USA) que apresentava de acordo com o fabricante, grau de pureza $> 95\%$ após purificação no HPLC; proteolipídio PLP, extraído a partir de cérebro de rato Lewis de acordo com método de partição Folch-Pi (Waksman, 1954; Laes, 1983) utilizando mistura de solvente orgânico (clorofórmio-metanol), purificação em cromatografia de coluna Sephadex LH-60 e liofilizado para estoque; e a seqüência da glicoproteína MOG 92-106 (DEGGYTCCFFRDHSYQ), considerada encefalitogênica e indutora de EAE na linhagem SJL/J (Rosbo, 1998). Esta seqüência, sintetizada no Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da FIOCRUZ- RJ, apresentava grau de pureza $> 95\%$ confirmado em

cromatografia HPLC de fase reversa. Alíquotas de 200 µL de cada antígeno na concentração 1mg/mL foram estocadas à -20°C.

Foi utilizado o método de ELISA para identificação das imunoglobulinas reativas. Os experimentos foram realizados em microplaca de 96 poços (Corning, USA), recobertas com 50 µL dos diferentes antígenos na concentração de 10 mg/mL em tampão pH 8,0. As placas foram incubadas durante 18 h a 4°C. Posteriormente, o material não adsorvido foi desprezado e adicionado PBS pH 7,4 contendo 1g% de gelatina por 1h a 37° C para o bloqueio das interações inespecíficas. As placas foram lavadas 3x com PBS pH 7,4 e em seguida, adicionado 50 µL das amostras diluídas 1:100 em PBS-gelatina contendo 1% de Tween 20 (Merck do Brasil). As placas foram incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente em câmara úmida e por mais 1 hora a 4°C. Após incubação, as placas foram lavadas 5x com PBS contendo 0,05% Tween 20 (Sigma Chem. Co., USA) e incubadas por 18 horas a 4°C com 50 µL por poço do conjugado anti-IgA HRP ou anti-IgG HRP (Southern Biotech. Ass., USA) titulados numa diluição ótima. Numa última etapa, as placas foram lavadas novamente 5x com PBS-Tween 20 e a reação enzimática ocorreu após adição de 100 µL/ poço de um dos cromógenos: tetra metil di-hidroclorato de benzidina (TMB, Sigma Chem. Co., USA) contendo 0,1% H₂O₂ (Merck, Brasil) em tampão citrato pH 4,0 ou orto-fenileno diamino (OPD, Sigma Chem. Co, USA) contendo 0,1% H₂O₂ (Merck, Brasil) em tampão citrato pH 5,6. A reação foi finalizada com adição de 100 µL de H₂SO₄ 4N. A densidade óptica (D.O.) foi medida a 450 nm para as reações com o uso de TMB e 492 nm para OPD. O valor da absorbância controle foi obtido pela medida da D.O. correspondente ao anticorpo conjugado sem amostra e estes valores foram subtraídos do valor total obtido. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

3.4 Dosagem de Citocinas e Quimiocinas

A determinação no soro de citocinas (TNF-alfa, IFN-gama, IL-4) e quimiocina CCL-2 seguiu o protocolo de ELISA quantitativo descrito pelo fabricante (PeproTech INC, Rocky Hill, NJ). Os resultados expressos em pg/mL foram calculados a partir de uma curva padrão obtida por calibradores das citocinas recombinantes.

Os experimentos foram realizados em microplaca de 96 poços (Corning, USA), recobertas com 100 µL dos anticorpos de captura na concentração 0,5µg/mL por poço, solubilizado em PBS 1x pH 7,4, seguido de incubação por 18 horas. Em seguida, a placa foi lavada 4x com tampão de lavagem contendo PBS 1x e 0,05% de Tween 20 e, posteriormente, vertida em papel absorvente. Para evitar ligação inespecífica, foi adicionado uma solução de PBS 1x pH 7,4 com 1% de gelatina e incubado durante 60 min à temperatura ambiente, seguido de 4 lavagens com o tampão de lavagem. Neste momento, realizou-se a incubação com as amostras dos pacientes e o padrão, ambos previamente diluídos em tampão diluente contendo PBS 1x pH 7,4, 0,05% de Tween 20 e 0,1% de gelatina. As amostras utilizadas na diluição ótima (1:100) previamente determinada, foram aplicadas em um volume de 100 µL/poço. Todos os experimentos foram feitos em triplicata e os resultados representam a média dos valores obtidos.

O tempo de incubação desta etapa foi de 2 (duas) horas à temperatura ambiente. Ao final deste período, as placas foram lavadas com tampão de lavagem por 4x. Em seguida seguiu-se a incubação com anticorpo de detecção, 100 µL/poço, na concentração recomendada pelo fabricante de 0,5µg/mL durante 2 horas à temperatura ambiente. Ao término desse período de incubação, procedeu-se a lavagem como nas etapas anteriores.

A incubação com o conjugado avidina peroxidase na concentração recomendada de 0,5µg/mL foi de 30 minutos na temperatura ambiente. Numa última etapa, as placas foram lavadas novamente 4x com PBS-Tween 20 e a reação enzimática ocorreu após adição de 100 µL de um dos cromógenos orto-fenileno diamino (OPD, Sigma Chem. Co, USA) contendo 0,1% H₂O₂ (Merck, Brasil) em tampão citrato pH 5,6. A reação foi finalizada com adição de 100 µL de H₂SO₄ 4N. A densidade óptica (D.O.) foi medida a 492 nm. O valor da absorbância controle foi obtido pela medida da D.O correspondente ao anticorpo conjugado sem amostra e estes valores foram subtraídos do valor total obtido. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

3.5 Atividade das Gelatinases (MMP-2 e MMP-9)

A atividade das metaloproteinases -2 e -9 nas amostras de soro foi determinada pela técnica de zimografia. Inicialmente foi realizada eletroforese SDS-PAGE em um gel contendo 7,5% de poliacrilamida e 0,1% de gelatina e renaturação com tampão de incubação contendo 2,5% de Triton-X em agitação durante 30min. O gel foi incubado durante 18h a 37°C em tampão 50mM Tris-HCl pH 7,5, 10mM CaCl₂ e 1mM de KCl. Em seguida, o gel foi corado com Coomassie azul brilhante G-250 (Merck Brasil) e posterior descoloração até serem evidenciadas as bandas claras. A atividade das metaloproteinases foi avaliada a partir de uma alíquota de soro diluído em uma solução de tampão de amostra 2x. Os géis foram preservados e fixados em papel celofane umedecido. Em seguida, o gel foi fotografado (Câmera digital CANON PowerShot A540) e as bandas de lise como atividade enzimática relativa, foram analisadas utilizando programa SCION[®] (USA).

3.6 Análise estatística

A normalidade dos resultados foi testada utilizando o teste de Shapiro will. Como os resultados não foram normais, os dados foram analisados pelo teste-T não paramétrico, utilizando o programa GraphPad Prism 3.0 (USA). Somente valores de $p < 0,05$ foram considerados com significância estatística.

4 RESULTADOS

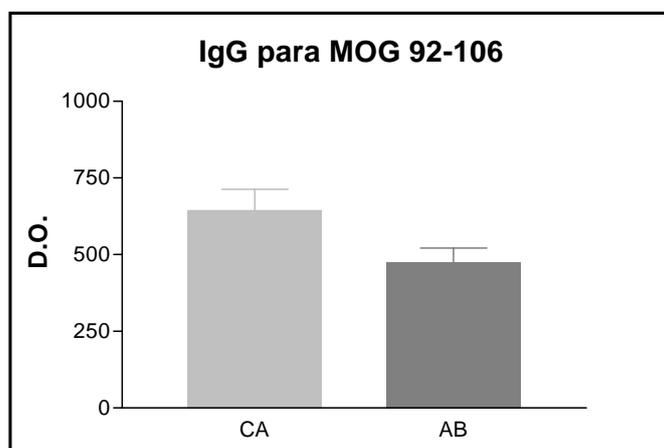
4.1 Influência da etnia na produção de IgG e IgA para antígenos da mielina

Trabalho anterior (Carvalho et al, 2003) do grupo mostrou que em relação ao grupo controle de indivíduos sadios, pacientes EM do Rio de Janeiro apresentavam aumento na produção de imunoglobulinas reativas IgA anti-PLP mas não do isotipo IgG. Enquanto para a seqüência do MOG 92-106 foi visto um aumento significativo ($p < 0,0001$) para ambos isotipos de IgA e IgG. Esses resultados mostraram a importância dessas moléculas na inflamação e possivelmente na regulação da resposta inflamatória na EM.

Como a população e pacientes EM do Rio de Janeiro é bastante miscigenada e heterogênea com afro-descendentes (AB) e caucasóides (CA) era importante verificar possíveis diferenças na reatividade imunológica entre pacientes EM para os mesmos antígenos, porém considerando-se a etnia.

Foi possível observar uma diferença significativa ($p < 0,05$) na produção de IgG (Figura 7a) e IgA (Figura 7b) para a seqüência MOG 92-106 sendo maior nos CA-EM (IgG = 643 ± 69 ; IgA = 889 ± 109) do que nos AB-EM (IgG = 472 ± 48 ; IgA = 588 ± 70). Em relação à molécula nativa de PLP, não se observou diferença significativa na produção de IgG (Figura 8a) e de IgA (Figura 8b) nos pacientes AB-EM (IgG = 252 ± 19 ; IgA = 405 ± 80) quando comparados com CA-EM (IgG = 274 ± 21 ; IgA = 366 ± 41).

a)



b)

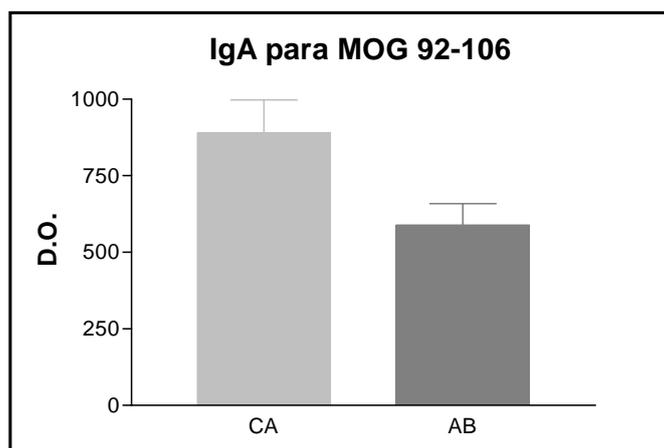
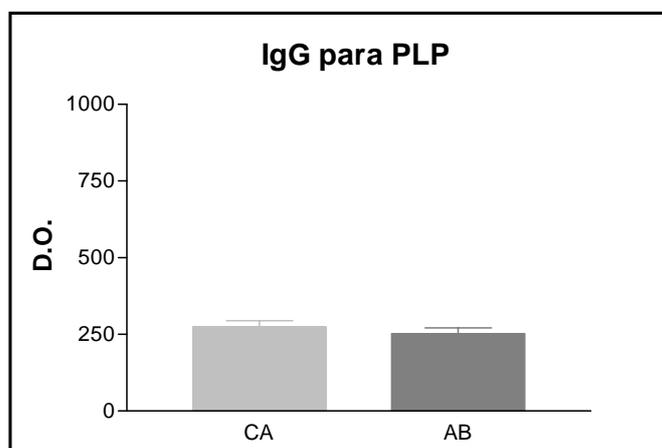


Figura 7. Imunoglobulinas reativas para seqüência MOG 92-106 considerando a etnia

(a) IgG e (b) IgA Foram incluídos 16 pacientes CA-EM e 10 pacientes AB-EM do Rio de Janeiro. Análise estatística realizada pelo teste t não paramétrico (GraphPad Prism). Aumento $p < 0,05$ de imunoglobulina A e G nos pacientes EM-CA comparados com EM-AB.

a)



b)

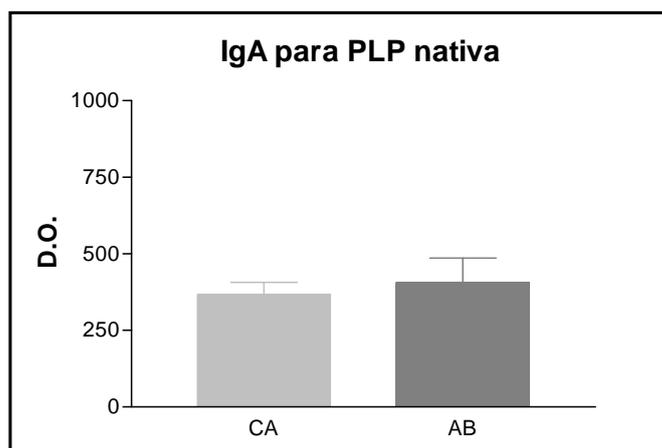


Figura 8. Imunoglobulinas reativas para PLP segundo a etnia

Determinação do nível sérico de IgG (a) e IgA (b) para molécula nativa de PLP. Foram incluídos 16 pacientes CA-EM e 10 pacientes AB-EM do Rio de Janeiro. Análise estatística realizada pelo teste t não paramétrico (GraphPad Prism). Não foi observada diferença significativa nas análises de imunoglobulina A e G nos pacientes.

4.2 Níveis séricos de citocinas e quimiocina CCL-2

Para analisar e comparar a possível influência da etnia na produção de citocinas IL-4 (regulatória), TNF-alfa e IFN-gama (inflamatórias), foram incluídos pacientes com EM-CA e EM-AB do RJ, e também um grupo homogêneo de pacientes EM da cidade de Ribeirão Preto, todos CA e mapeados como HLA-DR2

Foi observado (Figura 9), um aumento significativo nos níveis de TNF-alfa nos pacientes EM-CA do RJ ($327,8 \pm 74,5$) e o grupo de pacientes RP ($400,7 \pm 50,1$) em comparação com pacientes EM-AB ($191,5 \pm 59,5$) com valores de $p < 0,05$ e $p < 0,0001$, respectivamente. Contudo, não houve uma diferença significativa entre os EM-CA e o grupo EM-RP.

A análise dos níveis de IL-4 mostrou uma redução acentuada ($p < 0,0001$) na concentração dessa citocina nos pacientes EM-RP ($302 \pm 16,9$) em comparação aos EM-CA ($986,4 \pm 125,3$) e ao EM-AB ($941 \pm 100,3$). Contudo, não foi observada diferença significativa nos níveis de IL-4 entre os grupos EM-AB e EM-CA (Figura 10).

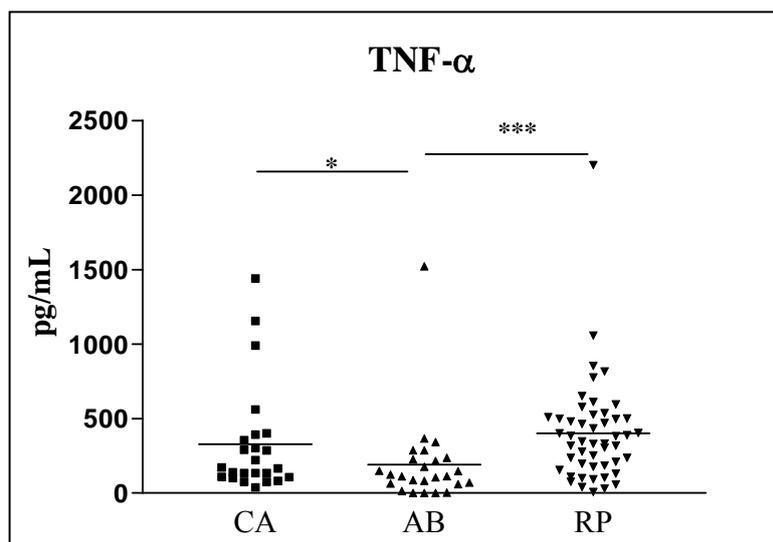


Figura 9. Níveis séricos de TNF-alfa segundo a etnia.

Foram incluídos 25 pacientes CA-EM e 25 pacientes AB-EM do Rio de Janeiro e 49 pacientes de EM-CA Ribeirão Preto (RP). Análise estatística realizada pelo teste t não paramétrico (GraphPad Prism). Aumento observado nos grupo EM-CA (RJ) e RP em relação ao EM-AB (RJ). $p < 0,05$ e $p < 0,0001$

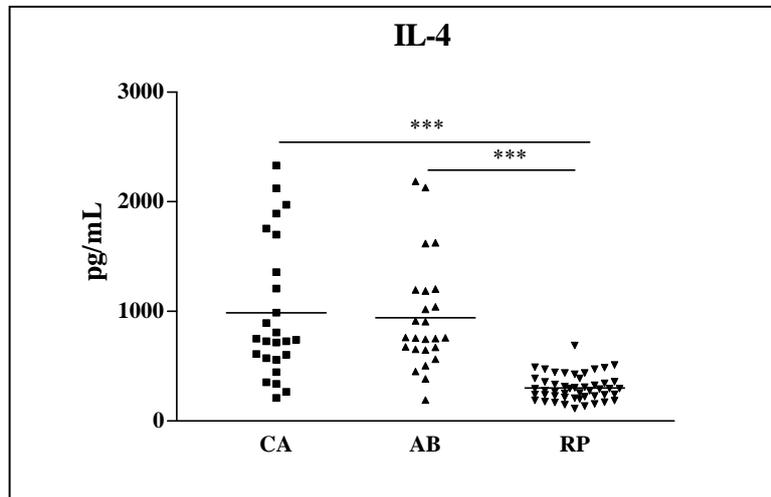


Figura 10. Níveis séricos de IL-4 segundo a etnia

Foram incluídos 25 pacientes CA-EM e 25 pacientes AB-EM do Rio de Janeiro e 49 pacientes EM-CA de Ribeirão Preto (RP). Análise estatística realizada pelo teste t não paramétrico (GraphPad Prism). Aumento observado nos grupos EM-CA e EM-AB do RJ em relação aos pacientes EM-CA de RP. $p < 0,0001$

Os níveis de IFN-gama foram elevados ($p < 0,001$) somente quando comparados os pacientes EM-CA ($568,6 \pm 37,6$) do RJ com o grupo CA-EM ($700,3 \pm 29,9$) de RP. No entanto, não houve diferença significativa entre os grupos étnicos EM-CA e EM-AB ($667,2 \pm 43,8$) e o EM-AB e o EM-RP, embora exista uma pequena diminuição na concentração dessa citocina no grupo CA (Figura 11).

Em relação aos níveis séricos da quimiocina CCL-2, não foi possível observar aumento significativo entre os grupos EM-CA ($412,5 \pm 42,7$), EM-AB ($407,5 \pm 44,1$) do RJ e EM-CA de RP ($489,1 \pm 33,1$) (Figura 12).

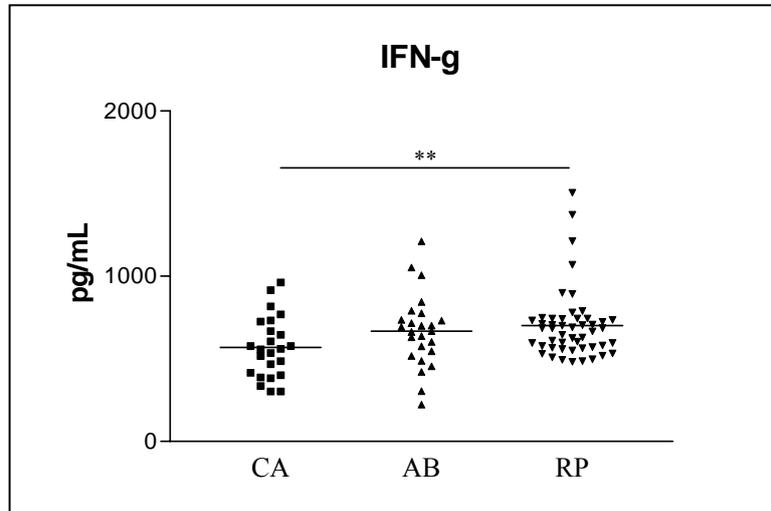


Figura 11. Níveis séricos de IFN-gama segundo a etnia.

Foram incluídos 25 pacientes EM-CA e 25 pacientes EM-AB do Rio de Janeiro e 49 pacientes EM-CA de Ribeirão Preto (RP). Análise estatística realizada pelo teste t não paramétrico (GraphPad Prism). Diminuição observada no grupo EM-CA em relação ao grupo EM-CA de RP. $p < 0,001$

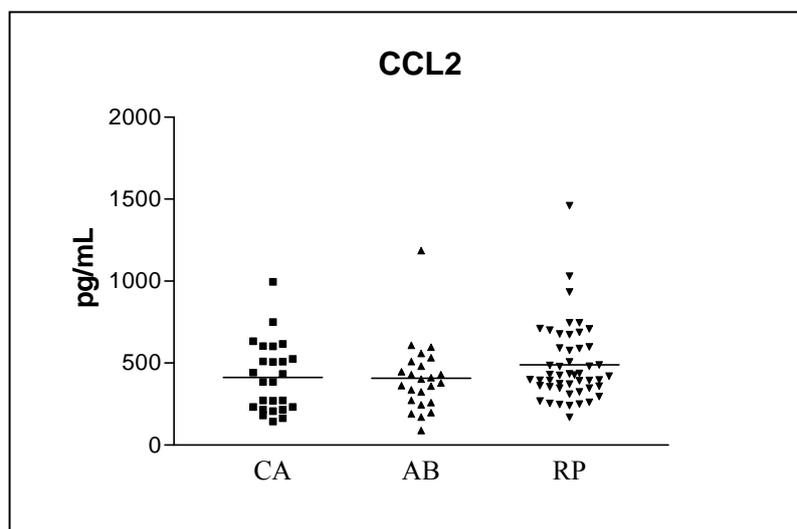


Figura 12. Níveis séricos de CCL-2 segundo a etnia

Foram incluídos 25 pacientes EM-CA e 25 pacientes EM-AB do Rio de Janeiro e 49 pacientes EM-CA de Ribeirão Preto (RP). Análise estatística realizada pelo teste t não paramétrico (GraphPad Prism). Não foi observada diferença estatisticamente significante.

4.3 Atividade das gelatinases

A figura 13 é um zimograma representativo após a reação de lise pelas gelatinases A e B (respectivamente, MMP-2 e -9) presentes no soro. A banda mais predominante no gel representa a atividade da MMP-9 (92 kDa). Baseado também no peso molecular, a banda que aparece na extremidade superior do gel representa a atividade da forma dímera da MMP-9. Além disso, a banda que corre com o peso molecular mais baixo que a MMP-9 representa a atividade da MMP-2.

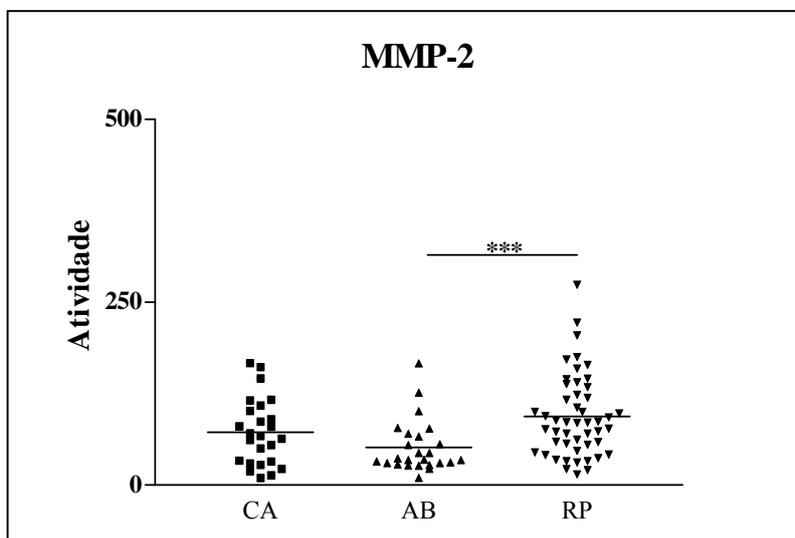
Figura 13. Zimograma

Gel SDS-PAGE 7,5 % contendo gelatina corado com Comassie Blue G-250 e descorado com solução metanol/ ácido acético.

As análises de MMPs -2 e -9 estão apresentadas nas figuras 14a e 14b, respectivamente. Em relação a MMP-2, os pacientes EM-CA do grupo RP ($93,8 \pm 8,0$)

mostraram uma atividade marcadamente maior ($p < 0,0001$) que os pacientes do Rio de Janeiro: EM-AB ($51,5 \pm 7,2$) e EM-CA ($31,79 \pm 19,06$), embora não foi significativa a diferença na diminuição da atividade em relação os pacientes de RP. Em contraste, os pacientes EM-AB ($200,3 \pm 30,5$) e EM-CA ($257,5 \pm 31,2$) do Rio de Janeiro, apresentaram atividade de MMP-9 maior ($p < 0,0001$) que os pacientes CA-EM de RP ($90,7 \pm 9,4$). Não foi encontrada diferença entre os pacientes EM-CA e os EM-AB do Rio de Janeiro.

a)



b)

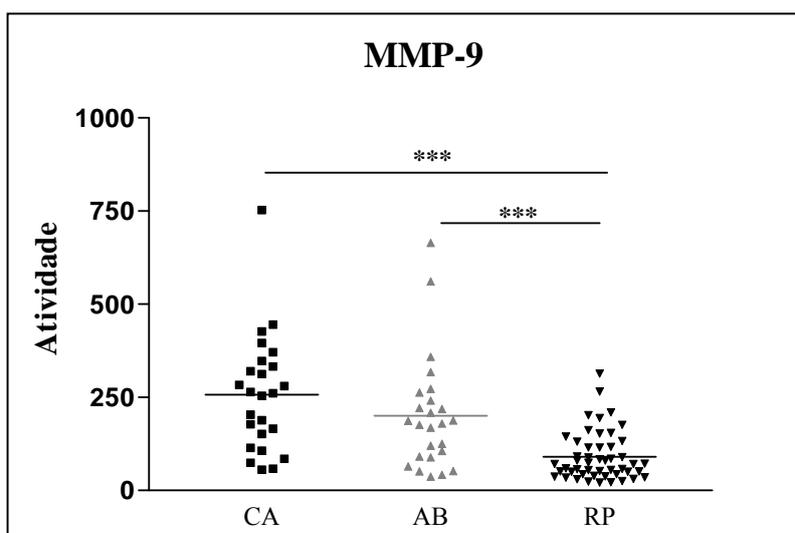


Figura 14. Atividade sérica das Metaloproteinasas (a) –2 e (b) –9

Foram incluídos 25 pacientes CA-EM e 25 pacientes AB-EM do Rio de Janeiro e 49 pacientes EM-CA de Ribeirão Preto (RP). Análise estatística realizada pelo teste t não paramétrico (GraphPad Prism). (a) Aumento da atividade no grupo RP comparado ao EM-AB. $p < 0,0001$. (b) Aumento da atividade nos grupos EM-CA e –AB comparados ao EM-RP. $p < 0,0001$.

4.4 Possível influência da etnia na neuroinflamação e tempo de doença

Considerando a hipótese da EM ocidental (*western-type*) de mudança no padrão Th2 para Th1 com a progressão e gravidade da doença, os pacientes do Rio de Janeiro foram agrupados em relação às suas características étnicas (AB e CA) e tempo de doença visando estabelecer uma possível influência na evolução da doença de acordo com a etnia.

Analisando os níveis de TNF-a (Figura 15) foi possível observar que os pacientes EM-CA mantêm uma concentração relativamente constante ao longo do tempo (< 5 anos: $277,7 \pm 90,6$; 5 a 10 anos: $436,7 \pm 256,6$; > 10 anos: $335,8 \pm 116,3$). Em contraste (Figura 15), os níveis séricos de TNF-a nos pacientes EM-AB aumentaram consideravelmente ($p < 0,05$) nos pacientes com mais de 10 anos de doença (<5anos: $121,8 \pm 32,2$; 5 a 10 anos: $109,8 \pm 27,5$; > 10 anos: $487,1 \pm 262,8$).

A concentração sérica de IFN-gama encontrada nos pacientes EM estudados não variou muito nos grupos separados etnicamente e temporalmente (< 5 anos – CA: $577,2 \pm 172,4$; - AB: $707,3 \pm 229,9$; 5 a 10 anos - CA: $569,7 \pm 274,7$; - AB: $532,0 \pm 195,4$; >10 anos – CA: $553,1 \pm 157,8$; - AB: $752,2 \pm 161,1$), embora tenha sido encontrada uma diferença entre o grupo de CA e AB ($p = 0,1$) nos pacientes com mais de 10 anos de doença.

Ao contrário das outras duas citocinas citadas anteriormente (TNF-alfa e IFN-gama), a IL-4 estava mais diminuída no grupo dos EM-AB ($612,3 \pm 139,3$) quando comparada com os EM-CA ($910,1 \pm 223,7$) nos pacientes com mais tempo de doença ($p = 0,07$). E não houve diferença significativa entre as etnias nos outros grupos temporais, não ocorrendo significância na comparação dos níveis de IL-4 na escala temporal da

doença (<5 anos – CA: $980,5 \pm 176,4$; -AB: $961,5 \pm 138,3$; 5 a 10 anos – CA: $1109 \pm 342,7$; - AB: $139 \pm 209,4$).

Um dado interessante foi a pouca variação nos níveis da quimiocina CCL-2, entre os grupos em relação à etnia e tempo de doença (<5 anos – CA: $437,1 \pm 67,85$; - AB $373,0 \pm 46,18$; 5 a 10 anos – CA: $368,4 \pm 100,7$; - AB: $361,0 \pm 55,23$; >10 anos - CA: $391,4 \pm 56,70$; - AB: $553,1 \pm 160,2$). No entanto, os pacientes EM AB com maior tempo de doença apresentaram níveis maiores da molécula no soro embora esse resultado não seja estatisticamente significativo. Isto sugere que esteja ocorrendo um recrutamento de células acentuado para o SNC nos pacientes EM-AB com mais de 10 anos de doença tornando a doença mais grave nesses pacientes.

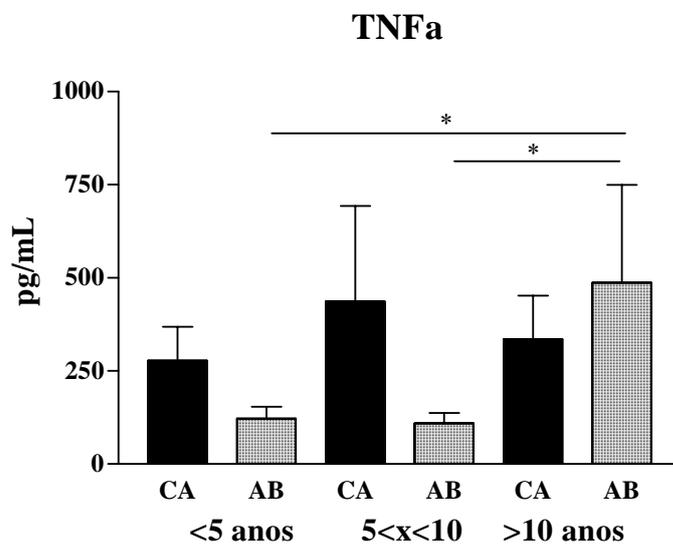


Figura 15. Concentrações séricas de TNF-alfa em relação a etnia e o tempo da doença

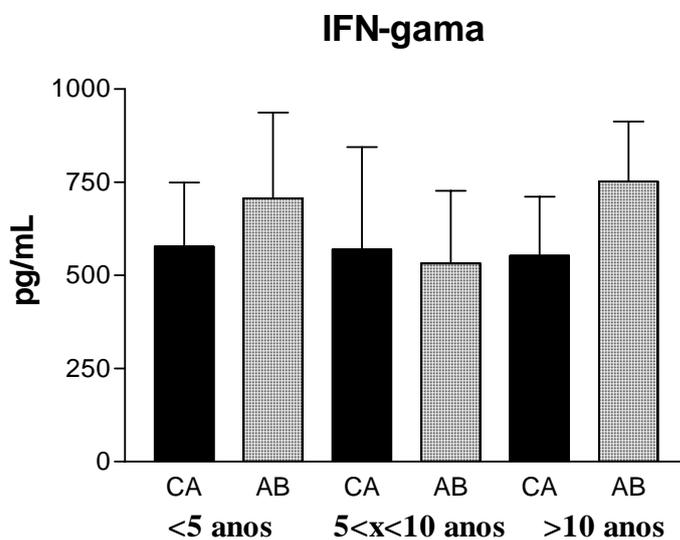


Figura 16. Concentrações séricas de IFN-gama em relação a etnia e o tempo da doença

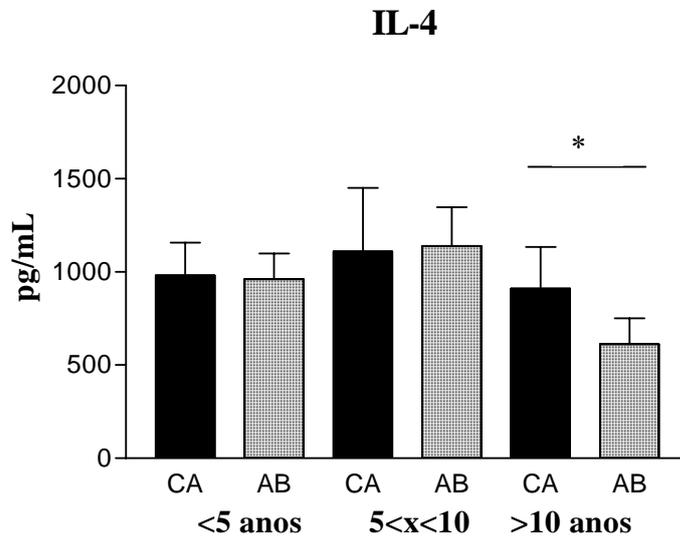


Figura 17. Concentrações séricas de IL-4 em relação a etnia e o tempo da doença

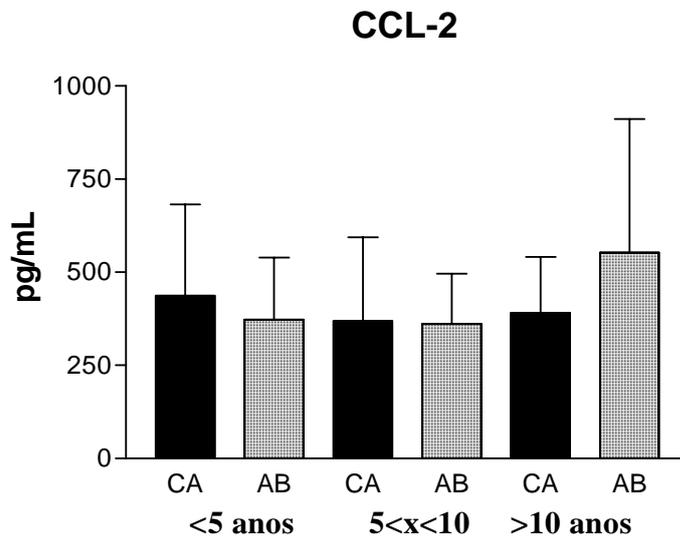


Figura 18. Concentrações séricas de CCL-2 em relação a etnia e o tempo da doença

5 DISCUSSÃO

Esclerose Múltipla é uma doença neurológica crônica complexa de etiologia multifatorial mais comum em adulto jovem (Noseworthy et al, 2000). Neste contexto, novos estímulos ambientais desencadeadores promovem interação com fatores genéticos influenciando na patogenia da doença (Ebers, 1995; Holmes, 2005). De fato, o surgimento de doenças associadas a determinados grupos étnicos em populações onde eram inexistentes ou muito raros, indica que combinações genéticas da miscigenação racial e fatores epigenéticos podem modificar padrões de susceptibilidade previamente estabelecidos (Sotgiu et al., 2004).

A população Brasileira, principalmente a da cidade do Rio de Janeiro é bastante heterogênea pela sua história de ocupação durante a colonização. Talvez isto explique o número elevado de Afro-descendentes com EM, o que não acontece em outras populações (Wallin et al, 2004; Papais-Alvarenga et al., 2004; Alves-Leon et al., 2006; Quirico-Santos et al., 2007). Devido à intensa miscigenação da população do Rio de Janeiro, foi escolhido como controle pareado, uma população geneticamente mais homogênea. Os pacientes EM de Ribeirão Preto (São Paulo) são todos CA e apresentam o haplótipo HLA-DR2, associado com susceptibilidade a EM nos países de clima temperado. Este grupo geneticamente mais homogêneo reflete a marcante influência caucasiana européia oriunda da colonização italiana. Não há relato de pacientes AB com EM nessa região. Não se sabe se esse fato se dá pelo número reduzido de negros na região ou se os AB dessa região possuem um padrão de resistência genética à EM.

A etiopatogenia da EM ainda é desconhecida embora um distúrbio ou processo infeccioso sistêmico contribua para o desencadeamento da inflamação recorrente de

natureza autoimune com lesões desmielinizantes no SNC (Weiner et al., 2002; Noseworthy et al., 2000; Wingerchuk, 2001, Correale et al., 2002). A inflamação em diferentes regiões do cérebro e a heterogeneidade das manifestações clínicas nos pacientes EM parece ser influenciada pela especificidade do reconhecimento antigênico dos linfócitos T ativados que migram para o SNC e também por mecanismos efetores dependentes de imunoglobulinas reativas (Weiner et al. 2002; Correale et al., 2002, Al-Omaishi et al., 1999).

Um aspecto importante da participação dos linfócitos B na desmielinização refere-se à sua capacidade de funcionar como célula acessória na apresentação de antígenos solúveis durante a resposta imune inicial. Estudos realizados no modelo da EAE (Lindert et al., 1999; Haase et al., 2001) indicam que imunoglobulinas reativas para proteínas da superfície da bainha de mielina (ex. MOG, PLP) exercem papel importante na citotoxicidade de oligodendrócitos e contribuem para o desenvolvimento e manutenção da desmielinização em roedores e primatas. A deposição do complexo antígeno-anticorpo na superfície da mielina desencadeia ativação da cascata do sistema complemento, podendo via interação com receptores para fração Fc (FcRI) presentes nos macrófagos ativados e microglia levar à destruição de oligodendrócitos e fagocitose da mielina (Abdul-Majid, 2002). De fato, experimentos *in vivo* de depleção de células B com anti-IgM e também no modelo de camundongo nocaute foram capazes de proteger animais suscetíveis da desmielinização experimental induzida por MOG (Correale et al., 2002).

Nesse trabalho foi evidenciado que nos pacientes do Rio de Janeiro, os níveis séricos de imunoglobulinas reativas IgG específicas para MOG 92-106 estavam mais aumentados ($p < 0,05$) no grupo CA do que no grupo AB. Foi encontrado também um

aumento, embora não significativo, nos níveis de IgA para PLP nos pacientes AB em relação aos CA.

A expressão de MOG nos estágios tardios da mielinização durante o desenvolvimento e a sua localização mais externa na bainha da mielina, torna essa molécula um indutor de potente resposta imune mediada por anticorpo e componentes do sistema complemento (Rosbo et al., 1998). Vale ressaltar que anticorpos contra a seqüência MOG 92-106 causam desmielinização *in vitro* em culturas mielinizadas e também *in vivo* em modelos experimentais da EAE (Linington et al., 1988; Kroepfl et al., 1996). A presença de imunoglobulinas IgG reativas anti-MOG nas lesões e placas desmielinizantes de pacientes EM (Genain et al., 1999) indica que anticorpos anti-MOG são capazes de causar destruição da mielina (Genain et al., 1995; Schluesener et al., 1987; Storch et al. 1998; Litzemberger et al., 1998). De fato, a resposta das células B ao MOG está aumentada nos pacientes EM (Schluesener et al., 1987; Sun et al., 1991). Dados mais recentes, indicam que a presença de níveis elevados de IgG anti-MOG relacionam-se com lesões ativas evidenciadas na ressonância magnética, servindo inclusive com valor prognóstico de exacerbações (Berger et al., 2003).

A produção elevada de imunoglobulina reativa do isotipo IgA sugere que a porção lipídica do proteolípido PLP funcionando como hapteno, favoreça o reconhecimento imunológico pelos linfócitos B e influencie na produção de citocinas reguladoras (IL-4, IL-10, TGF- β) (Carvalho et al., 2003). Os anticorpos também podem desempenhar um papel benéfico, desviando a produção de citocinas de um padrão Th1 para Th2 e/ou estimulando a mielinogênese. Alguns grupos sugerem a participação direta desses anticorpos na manutenção da resposta inflamatória no SNC, afetando o controle da rede idiotípica e/ou

promovendo via FcR a ativação de leucócitos e secreção de quimiocinas (Correale et al. 2002; Hogarth, 2002).

O Sistema Nervoso Central é um microambiente imunologicamente especializado que influencia a resposta imune local, embora a migração de células T e também células B para o SNC também ocorra em condições fisiológicas, em condições de neuroinflamação essas células participam na manutenção da inflamação inclusive na formação local de tecido linfóide terciário (Uccelli et al, 2005). A alteração no balanço das citocinas pode representar parte da patogênese da doença autoimune. No entanto, essas alterações podem ser um epifenômeno de uma doença inflamatória mais complexa que o efeito causal na cascata patológica (Imitola et al, 2005). Nesse trabalho foi mostrado que pacientes EM caucasóides apresentam em comparação com Afro-descendentes uma produção elevada de TNF alfa. Interessante ressaltar que o aumento foi mais acentuado ainda no grupo de pacientes EM de Ribeirão Preto (caucasóides), uma população mais homogênea (HLA-DR2+) do que nos pacientes CA do Rio de Janeiro. TNF-alfa é uma citocina produzida por macrófagos, microglia e astrócitos nas lesões ativas no SNC (Canella & Raine, 1995) (Hofman et al, 1989, Selmaj et al, 1991; Canella & Raine, 1995). Alguns estudos (Selmaj et al, 1991; Zipp et al, 1995; Andrews et al 1998; Van Oosten et al, 1998) mostram correlação positiva entre os níveis dessa citocina no soro e líquido com o curso clínico e atividade da doença pelas imagens e ressonância magnética (Spuler et al, 1996). TNF-a induz apoptose de células progenitoras de oligodendrócitos (CPO) *in vitro* e potencia o efeito apoptótico do IFN-gama (Cammer, 2000) (Andrews et al, 1998). O aumento marcante do TNF alfa nos pacientes de Ribeirão Preto indica uma doença com curso clínico mais severo do que nos pacientes do Rio de Janeiro. Além disso, também foi observado uma diferença entre as

etnias nos pacientes do Rio de Janeiro. De fato pacientes EM-CA apresentavam níveis mais elevados de TNF α que os Afro-descendentes. Esses dados indicam uma doença com curso semelhante (maior morbidade) às regiões com alta susceptibilidade nos pacientes EM de Ribeirão Preto, e curso menos severo nos Afro-descendentes. Talvez a miscigenação racial esteja influenciando no curso da doença ao conferir menor morbidade e características mais atenuadas de neuroinflamação. Esta hipótese ganha relevância pelas recentes evidências (Olas et al., 2005) mostrando diferenças no perfil de produção de imunoglobulinas entre grupo étnicos distintos, e que IgA exerce atividade imunomodulatória com efeito anti-inflamatório dose-dependente, ao diminuir liberação de IL-6, TNF- α , MIP-1 e MCP-1 de células mononucleares do sangue periférico.

Citocinas com padrão tipo Th1, como interferon gama e interleucina 2 são cruciais na manutenção da homeostase do hospedeiro contra patógenos intracelulares e neoantígenos. Contudo estão implicadas também na rejeição de aloenxertos e manutenção de resposta imune a órgãos específicos (ex. EM). Em contraste, citocinas Th2 como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-10 induzem produção de imunoglobulinas importantes na defesa do hospedeiro contra infestações de helmintos, mas também mediam inflamação alérgica (ex: asma, atopia). As respostas Th1 e Th2 são, na maioria das vezes, mutuamente antagônicas e tendem a regular uma a outra, uma propriedade que tem sido explorada com sucesso no desenho de terapias com citocinas para o tratamento de uma variedade de doenças (Coffman 2006; Arif et al., 2004).

Dados da literatura mostram que tratamento de pacientes EM com IFN gama agrava as exacerbações e a morbidade (Panitch HS et al., 1987), talvez por induzir a liberação de proteína HMGB1 por um mecanismo dependente de TNF α (Rendon-Mitchell et al.,

2003; Li et al., 2003). Embora HMGB1 não seja liberado por células apoptóticas mesmo após necrose secundária, é passivamente liberado por células em processo de necrose nas áreas de injúria (Scaffidi et al., 2002) amplificando assim o processo inflamatório ao induzir a liberação de mais citocinas inflamatórias. O estímulo inflamatório (ex: antígenos microbianos) ativa uma cascata de sinalização intracelular que culmina com a liberação seqüencial de citocinas proinflamatórias precoces (TNFalfa, IL1beta, IL-6, IFNgama) e tardias (MIF e HMGB1). IFN-gama é uma citocina capaz de aumentar a produção de citocinas proinflamatórias como também exercer um papel protetor na reposta imune pela restrição da infiltração, ativação e proliferação de neutrófilos (Tran et al, 2000). Embora exista uma diminuição dos níveis dessa citocina no grupo CA em relação ao grupo RP, essa diferença não foi significativa entre os grupo étnicos do Rio de Janeiro, sugerindo que o IFN gama tenha uma função mais imunoreguladora da neuroinflamação nos pacientes do EM do RJ. Esta hipótese é fortalecida pelos dados mostrando aumento na produção de IgA (Figura 7b e 8b) para seqüências encefalitogênicas (MOG, PLP) da mielina Estes resultados indicam, a importância de estudos posteriores comparando-se a produção das citocinas tardias (MIF e HMGB1) nos pacientes EM de ambos grupos, e relacionado com a evolução clínica e a presença de REGA.

Antígenos da mielina (MBP, PLP) desempenham um papel importante na neuroinflamação, na fase ativa predominam linfócitos CD4+ Th1 e citocinas proinflamatórias (TNFalfa; IFNgama, IL-12) (Voskuhl et al., 1993) enquanto na remissão clínica, predominam linfócitos T PLP-específicos com características Th2, secretando citocinas regulatórias: IL-4, IL-10 e TGFbeta (Correale et al., 1995). Esses trabalhos corroboram os nossos resultados mostrando que os pacientes Afro-descendentes do Rio de

Janeiro, principalmente aqueles com menos de 5 anos de doença, possuem um perfil de células T PLP-específicas e secreção de citocinas regulatórias (perfil Th2). Em contraposição, o grupo homogêneo de descendentes caucasianos DR2+ de Ribeirão Preto, apresentou um padrão mais inflamatório de citocinas. Embora não tenha sido analisado o perfil de imunoreatividade para antígenos da mielina é provável que este grupo de pacientes também apresentem aumento de IgG específicas para seqüência encefalitogênica do MOG.

As MMPs desempenham papel importante na inflamação e no remodelamento tecidual associado com reparo e regeneração. MMPs afetam a função da microvasculatura cerebral pela atuação lesiva direta da lâmina basal que circunda os vasos causando ruptura da BHE (Bar-Or, 2003; Sellebjerg and Sorensen, 2003) facilitando a entrada de leucócitos no SNC. As células do microambiente cerebral: neurônios, células da glia, células endoteliais e células imunes produzem MMPs constitutivas e induzidas em resposta ao estresse celular (Rosenberg et al., 2001), podendo degradar componentes da mielina (Chandler et al, 1995) e liberar novos autoantígenos (REGA) que amplificam a resposta imune-inflamatória.

Foi encontrado nesse trabalho que atividade da MMP-9 maior em pacientes EM-CA e -AB do Rio de Janeiro ($p < 0,0001$) do que nos pacientes EM de Ribeirão Preto. Por outro lado, a atividade da MMP-2 foi mais acentuada mais nos pacientes EM de Ribeirão Preto ($p < 0,0001$) especialmente em relação ao grupo de Afro-descendentes. Interessante ressaltar o aumento na atividade da MMP-2 também nos pacientes CA do Rio de Janeiro, embora não sendo essa diferença significativa, talvez pela inclusão de poucos pacientes ($n=25$). Esses resultados sugerem uma migração contínua de células inflamatórias para o SNC nos

pacientes Afro-descendentes (AB) do Rio de Janeiro. De fato, MMP-9 participa no controle da clivagem e liberação de ICAM-1 aumentando a migração celular da periferia para locais inflamados (Tsakadze et al, 2005). Por outro lado, a intensa produção de MMP-2 nos pacientes CA de Ribeirão Preto sugere um padrão de inflamação local mais intenso e em atividade, devido à produção constante de MMP-2 por astrócitos e microglia (Jovanova-Nesic and Shoenfeld, 2006). Nos pacientes EM-CA do Rio de Janeiro parece que ocorre a migração intensa de leucócitos da periferia para o local inflamado e o aumento, não significativo, da MMP-2 sugere a inflamação local mais acentuada que nos EM-AB, porém bem menos intensa que nos pacientes de Ribeirão Preto.

Outras moléculas muito importantes durante o recrutamento de células no processo inflamatório são as quimiocinas ou citocinas com atividade quimiotática, que possuem a capacidade de induzir e direcionar via interação com os seus receptores a migração celular em processos fisiológicos e patológicos (Hartung et al, 2000; Ransohoff et al., 2003; Owens et al, 2005). Dentre a grande variedade de quimiocinas conhecidas atualmente, foi escolhida a molécula CCL-2 (MCP1) devido a sua maior capacidade de interação, atração e ativação de células da linhagem monocítica (Luster 1998; Simpson et al, 1998; Tanuma et al, 2006). Além disso existem dados contraditórios na literatura, envolvendo a participação dessa quimiocina e/receptores na neuroinflamação tanto no modelo experimental, EAE como em pacientes com EM (McManus et al, 1998; Simpson et al, 1998; Sorensen et al, 1999). Como, aumento na expressão de CCR2 em monócitos e células T do sangue periférico de pacientes com a forma progressiva secundária mas não na forma surto-remissiva Sorensen et al (2001). Existe um relato na literatura (Stamatovic et al, 2006) com indicações de que a própria molécula de CCL2 também atua em conjunto ou independente

das MMPs na permeabilização da BHE e na formação do edema vasogênico favorecendo assim o início e o estabelecimento do processo neuroinflamatório. Outras citocinas e quimiocinas como CCL5 (RANTES), com interação preferencial por linfócitos, também devem apresentar padrão de detecção diferenciado nesses grupos, uma vez que na EM os linfócitos T possuem papel de destaque na patogênese. Vale ressaltar o papel das MMPs clivando e ativando citocinas e fatores tróficos que poderiam influenciar também nessas diferenças de padrão de resposta imunológica.

Os resultados observados com o decorrer do tempo de doença, nos pacientes do Rio de Janeiro, mostram que ao longo dos anos os pacientes EM-CA mantêm o mesmo perfil neuroinflamatório. Contudo, os Afro-descendentes mostram uma mudança drástica do perfil inflamatório com aumento de TNF-alfa ($p < 0,05$), diminuição de IL-4 e aumento de CCL-2. Considerando que o TNF-alfa é um marcador da atividade da doença (Spuler et al, 1996) pode-se considerar que os pacientes EM Afro-descendentes do Rio de Janeiro estudados apresentam agravamento da neuroinflamação com o tempo de doença. Estes dados estão de acordo com evidências clínicas (Papais-Alvarenga et al., 2003) mostrando que pacientes EM Afro-descendentes brasileiros apresentam de acordo com o tempo da doença, aumento da morbidade e mortalidade em relação aos pacientes brasileiros EM-Caucasóides.

Uccelli et al. (2005) relatam a formação do tecido linfóide terciário e independência da periferia para manutenção da inflamação. O estímulo de IL-4 em células MOG-específicas de pacientes com EM foi capaz de redirecionar a resposta Th1 para Th2 diminuindo a expressão de IFN-gama e aumentando a produção de IL-4 (Hallin E. et al, 2006). Os pacientes Afro-descendentes parecem tentar manter um perfil Th2 com produção

elevada de IL-4, IgA para PLP e baixos níveis de produção de TNF-alfa, mas em algum dado momento, o sistema faz uma mudança no perfil da doença o que a torna muito mais grave, semelhante ao já descrito (Cree, 2004). Klaus GG (1979) mostrou que IgA aumenta a indução de células de memória imunológica para anticorpos solúveis, podendo isso ser a razão pela qual ocorre essa mudança.

O acúmulo de células B no SNC pode contribuir para a patogênese da EM através de múltiplos mecanismos, tais como: fixação do complemento, rede anti-idiotípica, apresentação de antígeno e produção de citocinas pró-inflamatórias. Células B de memória podem contribuir também para a amplificação da resposta de células T no SNC pela apresentação de peptídeos crípticos imunogênicos. A possibilidade de manutenção da inflamação no SNC e/ou autonomia da periferia pode resultar na piora dos sintomas no grupo AB.

A desmielinização não somente causa danos na transmissão neural diretamente, mas também aumenta a vulnerabilidade para enzimas proteolíticas e citocinas produzidas pelas células da glia e imunes ativadas (Mandal, 2003). Citocinas e metaloproteinases desempenham um papel de regulação do sistema imune e são importantes alvos para imunomodulação. A caracterização do perfil imunológico de cada população é importante para obter as terapias mais indicadas. A tentativa de impedir essa mudança Th2 para Th1 é fundamental para a qualidade de vida dos pacientes Afro-descendentes. A generalização dos tratamentos leva, além dos malefícios causados aos pacientes, aos gastos excessivos com medicamentos errados cedidos pelo governo.

6 CONCLUSÕES

- Os resultados evidenciados nesse trabalho mostram uma diferença significativa na concentração de mediadores inflamatórios nos grupos étnicos estudados de pacientes com Esclerose Múltipla do Rio de Janeiro e Ribeirão Preto, mostrando a necessidade da identificação desse perfil para o início do tratamento;
- O papel importante das células B na patogenia da EM, atuando em consonância com células T autoreativas, talvez possa estar modulando a produção de citocinas e quimiocinas, variando a progressão e gravidade da doença;
- O aumento nos níveis de TNF-alfa e diminuição drástica de IL-4 nos pacientes caucasóides (CA) da cidade de Ribeirão Preto em relação aos EM-AB e EM-CA do Rio de Janeiro mostram o padrão de resposta regulatória que a população de pacientes EM do Rio de Janeiro tenta manter, principalmente os pacientes EM-AB, contrastando com a população de pacientes EM de Ribeirão Preto;
- O IFN-gama sérico parece não ter uma importância crucial na diferença do perfil inflamatório entre os grupos étnicos de pacientes estudados, embora seus níveis estejam diminuídos nos pacientes EM-CA comparados com os de Ribeirão Preto, sugerindo que está atuando de forma regulatória;
- A maior produção de MMP-9 e menor detecção de CCL2 nos pacientes do Rio de Janeiro, sugere uma maior migração e/ou recrutamento de células inflamatórias, contudo o aumento da MMP-2 e maior detecção do CCL-2 sugere que a inflamação já está estabelecida no sistema nervoso central, independente da periferia;

- A atividade elevada de MMP-9 pode estar gerando, principalmente nos Afro-descendentes, novos epítomos autoreativos pela degradação de proteínas da mielina;
- A produção de IgA para epítomos da mielina pode atuar induzindo células de memória imunológica que ao longo do tempo pode contribuir para mudança no perfil da doença nos Afro-descendentes;
- Considerando a hipótese da EM tipo ocidental, estes resultados indicam que uma mudança no perfil Th2 para Th1 em pacientes Afro-descendentes ocorra ao longo do tempo, tornando a doença de um perfil mais regulatório para um perfil mais severo da doença com maior morbidade e mortalidade que nos Caucasianos.

7 HIPÓTESE

O conjunto de trabalhos na literatura indica que a EM é uma doença bem mais heterogênea e complexa no que tange alterações e mecanismos imunopatológicos da neuroinflamação influenciando a evolução e morbidade da doença. Os resultados do presente trabalho mostram a existência de diferença marcante no perfil inflamatório, progressão e gravidade da EM nos diferentes grupos étnicos. Com os resultados apresentados nesse trabalho associados aos dados encontrados na literatura a seguinte hipótese foi formulada:

Os brasileiros Afro-descendentes possuem um padrão genético (DR2 negativos) de resistência a doença, portanto, possuem estratégias imunológicas para regular a inflamação, tais como, produção de IgA para epítomos da mielina e altas produções de IL-4. No entanto, ao longo do tempo as imunoglobulinas do isotipo IgA ativam células B de memória. Além disso, a atividade aumentada de MMP-9 disponibiliza novos epítomos encefalitogênicos que aumentam a resposta inflamatória. Um tecido linfóide terciário é estabelecido no SNC e independente da periferia existe uma manutenção da inflamação com alta produção de MMP-2 pelas células residentes. Nesse caso, não há mais necessidade da entrada de novas células inflamatórias por isso não há tanta participação de MMP-9 e consumo de CCL2 na migração de leucócitos para o local inflamado. Nesse momento instala-se uma inflamação severa da doença com a mudança para um perfil Th1, mais inflamatório do que de início. Nos descendentes Caucásianos, esse padrão de formação de tecidos linfóides terciários já se estabelece em períodos mais iniciais da doença.

8 PERSPECTIVAS

Fazer estudo seqüencial de pacientes EM de diferentes etnias do Rio de Janeiro e Ribeirão Preto expressando ou não o haplótipo HLA-DR2, visando determinar:

1. perfil de reatividade imunológica para outras seqüências encefalitogênicas, relacionadas com ativação de subtipos característicos de linfócitos participando na modulação da neuroinflamação. Neste contexto serão analisados mediadores da neuroinflamação (citocinas, quimiocinas, componentes da imunidade inata) moléculas da adesão envolvidas na migração celular e remodelagem tecidual.
2. analisar a presença de polimorfismos nas citocinas inflamatórias (TNF α , IL4, IL4RA, IFN γ) associados com progressão da EM

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdul-Majid, K.B., Stefferl, ^a, Bourquin, C., Lassmann, H., Linington, C., Olsson, T., Kleinau, S., Harris, R.A. 2002. Fc receptors are critical for autoimmune inflammatory damage to the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Scand J Immunol.* **55**(1): 70-81.
- Abraham, M., Shapiro, S. et al. 2005. Gelatinases (MMP-2 and MMP-9) are preferentially expressed by Th1 vs. Th2 cells. *J Neuroimmunol* **163**(1-2): 157-164.
- Alloza, I., Heggarty, S. et al. 2002. Interleukin-12 p40 polymorphism and susceptibility to multiple sclerosis. *Ann Neurol* **52**(4): 524-525.
- Al-Omaishi, J., Bashir, R., Gendelman, H.E. 1999. The cellular immunology of multiple sclerosis. *J Leukocyte Biology* **65**(4): 444-452.
- Alter, M. 1962. Multiple sclerosis in the Negro. *Arch Neurol* **7**: 83-91.
- Ames, F.R., Louw, S. 1977. Multiple sclerosis in coloured South Africans. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **40**: 729-735.
- Ames, F.R., Bowen, R.M. 1979. First coloured South African with multiple sclerosis confirmed by necropsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **42**: 731-733.
- Andjelkovic, A.V., Kerkovich, D., Shanley, J., Pulliam, L., Pachter, J.S. 1999. Visualization of Chemokine Binding Sites on Human Brain Microvessels *Glia Dec*; **28**(3): 225-235.
- Andrews, T., Zhang, P., Bhat, N.R. 1998. TNFalpha potentiates IFNgamma-induced cell death in oligodendrocyte progenitors. *J Neurosci Res.* **54**(5): 574-583.
- Angelucci, F., Mirabella, M. et al. 2005. Serum levels of anti-myelin antibodies in relapsing-remitting multiple sclerosis patients during different phases of disease activity and immunomodulatory therapy. *Dis Markers* **21**(2): 49-55.
- Arefieva, T.I., Kukhtina, N.B., Antonova, A.O., Krasnikova, T.L. 2005. MCP-1-stimulated chemotaxis of monocytic and endothelial cells is dependent on activation of different signaling cascades *Cytokine* **31**(6):439-446.

- Arif, S., Tree, T.I., Astill, T.P., Tremble, J.M., Bishop, ^aJ., Dayan, C.M., Roep, B.O., Peakman, M. 2004. Autoreactive T cell responses show proinflammatory polarization in diabetes but a regulatory phenotype in health. *The Journal of Clinical Investigation* **113**(3): 451-463.
- Bach, J.F. 2002. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med.* **347**(12): 911-920.
- Bacon, K., Baqqioloni, M., Broxmeyer, H., Horuk, R., Lindley, I., Mantovani, A., Maysushima, K., Murphy, P., Nomiya, H., Oppenheim, J., Rot, A., Schall, T., Tsanq, M., Thorpe, R., Van Damme, J., Wadhwa, M., Yoshie, O., Zlotnik, A., Zoon. 2002. Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *Journal of Interferon and Cytokine Reserch* **22**(10): 1067-1068.
- Badovinac, V.P., Harty, J.T. 2000. Intracellular staining for TNF and IFN-gamma detects different frequencies of antigen-specific CD8(+) T cells. *J Immunol Methods.* **238**(1-2): 107-117.
- Bailey, P. 1922. Incidence of multiple sclerosis in United States troops. *Arch Neurol Psychiatry* **7**: 582-583.
- Balashov, K.E., Comabella, M., Ohashi, T., Khoury, S.J., Weiner, H.L. 2000. Defective regulation of IFN-gamma and IL-12 by endogenous IL-10 in progressive MS. *Neurology* **55**(2): 192-198.
- Bar-Or, ^a, Nuttall, R.K., Duddy, M., Alter, ^a, Kim, H.J., Ifergan, I., Pennington, C.J., Bourgoin, P., Edwards, D.R., Yong, V.W. 2003. Analyses of all matrix metalloproteinase members in leukocytes emphasize monocytes as major inflammatory mediators in multiple sclerosis. *Brain.* **126**(Pt 12): 2738-2749.
- Bar-Or, A. 2005. Immunology of multiple sclerosis. *Neurol Clin* **23**(1): 149-175, vii.
- Bates, D. and Ebers, G. 2003. Controversies across continents. Report from the MS Forum Symposium, September 2002, Baltimore, USA. *Int MS J* **10**(1): 32-33.
- Begolka WS, Miller SD. 1998. Cytokines as intrinsic and exogenous regulators of pathogenesis in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Res Immunol.* **149**(9): 771-781.

- Belmadani, A., Tran, P.B., Ren, D., Miller, R.J. 2006. Chemokines Regulate the Migration of Neural Progenitors to Sites of Neuroinflammation. *The Journal of Neuroscience* **26**(12): 3182-3191.
- Berger, T. and Reindl, M. 2000. Immunopathogenic and clinical relevance of antibodies against myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) in Multiple Sclerosis. *J Neural Transm Suppl* **60**: 351-360.
- Berger, T., Rubner, P. et al. 2003. Antimyelin antibodies as a predictor of clinically definite multiple sclerosis after a first demyelinating event. *N Engl J Med* **349**(2): 139-145.
- Biddison, W.E., Taub, D.D., Cruikshank, W.W., Center, D.M., Connor, E.W., Honma, K. 1997. Chemokine and matrix metalloproteinase secretion by myelin proteolipid protein-specific CD8+ T cells: potential roles in inflammation. *J Immunol.* **158**(7): 3046-3053.
- Bjartmar, C., Trapp, B.D. 2003. Axonal degeneration and progressive neurologic disability in multiple sclerosis. *Neurotox Res.* **5**(1-2): 157-164
- Bjorklund, M. & Koivunen, E. 2005. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta* **1755**(1): 37-69.
- Black, R.A., Rauch, C.T., Kozlosky, C.J., et al. 1997. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* **385**(6618): 729-733.
- Bornstein, M.B., Appel, S.H. 1959. Demyelination in cultures of rat cerebellum produced by experimental allergic encephalomyelitic serum. *Trans. Am. Neurol. Assoc.* **84**: 165-166.
- Boulanger, L.M. & Shatz, C.J. 2004. Immune Signalling In Neural Development, Synaptic Plasticity And Disease. *Nature Reviews Neuroscience* **5**: 521-526.
- [Brosnan, C.F., Cannella, B., Battistini, L., Raine, C.S.](#) 1995. Cytokine localization in multiple sclerosis lesions: correlation with adhesion molecule expression and reactive nitrogen species. *Neurology.* **45**:S16-21.

- Bruck, W. and Stadelmann, C. 2005. The spectrum of multiple sclerosis: new lessons from pathology. *Curr Opin Neurol* **18**(3): 221-224.
- Caballero, A., Alves-Leon, S. et al. 1999. DQB1*0602 confers genetic susceptibility to multiple sclerosis in Afro-Brazilians. *Tissue Antigens* **54**(5): 524-526.
- Callegaro, D., Goldbaum, M. et al. 2001. The prevalence of multiple sclerosis in the city of Sao Paulo, Brazil, 1997. *Acta Neurol Scand* **104**(4): 208-213.
- Cammer, W. 2000. Effects of TNFalpha on immature and mature oligodendrocytes and their progenitors in vitro. *Brain Res.* **864**(2): 213-219.
- Cannella B, Raine CS. 1995. The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* **37**(4): 424-435.
- Carvalho, A., Sant'anna, G. et al. 2003. Determination of autoantibody for myelin antigens in the serum of patients HLA-DQB1*0602 with multiple sclerosis. *Arq Neuropsiquiatr* **61**(4): 968-973.
- Chandler, S., Coates, R., Gearinq, A., Lury, J., Wells, G., Bone, E. 1995. *Neuroscience Letters* **201**(3): 223-226.
- Charcot, J. 1868. Histologie de la sclerose en plaque. *Gaz. Hopitaux* **41**: 554-566.
- Christensen, T. 2005. Association of human endogenous retroviruses with multiple sclerosis and possible interactions with herpes viruses. *Rev Med Virol* **15**(3): 179-211.
- Coffman, R.L. 2006. Origins of the TH1-TH2 model: a personal perspective. *Nature Immunol* **7** (6): 539-541.
- Comabella, M., Balashov, K., Issazadeh, S., Smith, D., Weiner, H.L., Khoury, S.J. 1998. Elevated interleukin-12 in progressive multiple sclerosis correlates with disease activity and is normalized by pulse cyclophosphamide therapy. *J Clin Invest.* **102**(4): 671-678.
- Correale, J., McMillan, M., McCarthy, K., Le, T., Weiner, L.P. 1995. Isolation and characterization of autoreactive proteolipid protein-peptide specific T-cell clones from multiple sclerosis patients. *Neurology.* **45**(7): 1370-1378.

- Correale, J., Bassani, M.M., Molinas, M.M.B. 2002. Oligoclonal bands and antibodies responses in multiple sclerosis. *J Neurol* **249**: 375-389.
- Coyle, P. K. 2005. Gender issues. *Neurol Clin* **23**(1): 39-60, v-vi.
- Cree, B.^a, Khan, °, Bourdette, D., Goodin, D.S., Cohen, J.^a, Marrie, R.^a, Glidden, D., Weinstock-Guttman, B., Reich, D., Patterson, N., Haines, J.L., Pericak-Vance, M., DeLoa, C., Oksenberg, J.R., Hauser, S.L. 2004. Clinical characteristics of African Americans vs Caucasian Americans with multiple sclerosis. *Neurology* **63**(11):2039-45.
- Czlonkowska, A., Ciesielska, A. et al. 2005. Estrogen and cytokines production - the possible cause of gender differences in neurological diseases. *Curr Pharm Des* **11**(8): 1017-1030.
- Davies, S., Nicholson, T. et al. 2005. Spread of T lymphocyte immune responses to myelin epitopes with duration of multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* **64**(5): 371-377.
- Derfuss, T., Hohlfeld, R. et al. 2005. Intrathecal antibody (IgG) production against human herpesvirus type 6 occurs in about 20% of multiple sclerosis patients and might be linked to a polyspecific B-cell response. *J Neurol.* **252**(8): 968-971.
- Dimitrijevic, O.B., Stamatovic, S.M., Keep, R.F., Andjelkovic, A.V. 2006. Effects of the chemokine CCL2 on blood-brain barrier permeability during ischemia-reperfusion injury. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **26**(6):797-810.
- Dymment, D.A., Ebers, G.C. et al. 2004. Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* **3**(2): 104-110.
- Dymment, D.A., Steckley, J.L. et al. 2004. TCR beta polymorphisms and multiple sclerosis. *Genes Immun* **5**(5): 337-342.
- Ebers, G.C., Sadovnick, A.D., Risch, N.J. 1995. A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. *Nature* **377**(6545): 150-151.
- Egg, R., Reindl, M., Deisenhammer, F., Linington, C., Berger, T. 2001. Anti-MOG and anti-MBP antibody subclasses in multiple sclerosis. *Mult Scler* **7**(5): 285-289.

- Ehling, R., Gassner, C. et al. 2004. Genetic variants in the tumor necrosis factor receptor II gene in patients with multiple sclerosis. *Tissue Antigens* **63**(1): 28-33.
- Fernandez, O., Fernandez, V. et al. 2004. DQB1*0602 allele shows a strong association with multiple sclerosis in patients in Malaga, Spain. *J Neurol* **251**(4): 440-444.
- Ferrero, S., Pretta, S., Ragni, N. 2004. Multiple sclerosis: management issues during pregnancy. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* **115**: 3-9.
- Foster, R.M., Harries, J.R. 1970. Multiple sclerosis in the African. *Br Med J* **3**: 628.
- Fox, N.C. et al. 2000. Progressive cerebral atrophy in MS: a serial study using registered, volumetric MRI. *Neurology* **54**: 807-812.
- Franciotta, D. and Lolli, F. 2005. Infectious causes of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* **4**(5): 268-269.
- Fukazawa, T., Kikuchi, S. et al. 2005. CTLA-4 gene polymorphism is not associated with conventional multiple sclerosis in Japanese. *J Neuroimmunol* **159**(1-2): 225-229.
- 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**: 170-175.
- Genain, C.P., Nguyen, M.H., Letvin, N.L., Pearl, R., Davis, R.L. et al. 1995. Antibody facilitation of multiple sclerosis-like lesions in a nonhuman primate. *J. Clin. Invest.* **96**: 2966-2974.
- Gijbels, K., Proost, P., Masure, S., Carton, H., Billiau, A., Opdenakker, G. 1993. Gelatinase B is present in the cerebrospinal fluid during experimental autoimmune encephalomyelitis and cleaves myelin basic protein. *J Neurosci Res.* **36**(4): 432-440.
- Gilden, D.H. 2005. Infectious causes of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* **4**: 195-202.
- Glabinski, A.R., Bielecki, B., O'Bryant, S., Selmaj, K., Ransohoff, R.M. 2002. *Journal of Autoimmunity* **19**(4): 175-181.

- Greenwood, J., Etienne-Manneville, S., Adamson, P., Couraud, P-O. 2002. Lymphocyte migration into the central nervous system: implication of ICAM-1 signalling at blood-brain barrier. *Vascular Pharmacology* **38**: 315-322.
- Gutierrez, J., Vergara, M.J. et al. 2002. Multiple sclerosis and human herpesvirus 6. *Infection* **30**(3): 145-149.
- Haase, C.G., Guggenmos, J. et al. 2001. The fine specificity of the myelin oligodendrocyte glycoprotein autoantibody response in patients with multiple sclerosis and normal healthy controls. *J Neuroimmunol* **114**(1-2): 220-225.
- Hafler, D.A. 2004. Multiple sclerosis. *The Journal of Clinical Investigation*. **113**(6): 788-794.
- Hafler, D.A., Slavik, J. M et al. 2005. Multiple sclerosis. *Immunol Rev* **204**: 208-231.
- Hallin, E., Mellerga, J., Vrethem, M., Ernerudh, J., Ekerfelt, C. 2006. In vitro Th2 deviation of myelin-specific peripheral blood lymphocytes from patients with multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology* **171**: 156- 162.
- Hartung, H.P., Jung, S., Stoll, G., et al. 1992. Inflammatory mediators in demyelinating disorders of the CNS and PNS. *J Neuroimmunol* **40**(2-3): 197-210.
- Hauser, S.L. 2005. An update on multiple sclerosis. *J Neurol Sci* **228**(2): 193-194.
- Hemmer, B., Archelos J.J., Hartung, H.P. 2002. New Concepts in The Immunopathogenesis Of Multiple Sclerosis. *Nature Reviews Neuroscience*. **3**: 291-301.
- Hofman, F.M., Hinton, D.R., Johnson, K., Merrill, J.E. 1989. Tumor necrosis factor identified in multiple sclerosis brain. *J Exp Med*. **170**(2): 607-612.
- Hogarth, P.M. 2002. Fc receptors are major mediators of antibody based inflammation in autoimmunity. *Curr Opin Immunol* **14**: 798-802.
- Holmes, S., Siebold, C. et al. 2005. Multiple sclerosis: MHC associations and therapeutic implications. *Expert Rev Mol Med* **7**(3): 1-17.
- Holmoy, T., Vandvik, B., Vartdal, F. 2003. T cells from multiple sclerosis patients recognize immunoglobulin G from cerebrospinal fluid. *Mult. Scler.* **9**:228-234.

- Holmoy, T. and Vartdal F. 2005. Infectious causes of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* **4**(5): 268.
- Iarlori, C., Reale, M., De Luca, G., Di Iorio, A., Feliciani, C., Tulli, A., Conti, P., Gambi, D., Lugaresi. 2002. Interferon beta-1b modulates MCP-1 expression and production in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology* **123**(1-2): 170-179.
- Imitola J, Chitnis T, Khoury SJ. 2005. Cytokines in multiple sclerosis: from bench to bedside. *Pharmacol Ther.* **106**(2): 163-177.
- [Issazadeh, S., Ljungdahl, ^a, Hojeberg, B., Mustafa, M., Olsson, T.](#) 1995. Cytokine production in the central nervous system of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis: dynamics of mRNA expression for interleukin-10, interleukin-12, cytolyisin, tumor necrosis factor alpha and tumor necrosis factor beta. *J Neuroimmunol.* **61**(2): 205-212.
- [Issazadeh S, Navikas V, Schaub M, Sayegh M, Khoury S.](#) 1998. Kinetics of expression of costimulatory molecules and their ligands in murine relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in vivo. *J Immunol.* **161**(3): 1104-1112.
- Izikson, L., Klein, R.S., Luster, A.D., Weiner, H.L. 2002. Targeting monocyte recruitment in CNS autoimmune disease. *Clinical Immunology* **103**(2): 125-131.
- Jovanova-Nesic, K., Shoenfeld, Y. 2006. MMP-2, VCAM-1 and NCAM-1 expression in the brain of rats with experimental autoimmune encephalomyelitis as a trigger mechanism for synaptic plasticity and pathology. *J Neuroimmunol.* **181**(1-2): 112-121.
- Kantarci, O.H., Andrade, M., Weinshenker, B.G. 2002. Identifying disease modifying genes in multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology* **123**: 144- 159.
- Kantarci, O.H., Goris, A. et al. 2005. IFNG polymorphisms are associated with gender differences in susceptibility to multiple sclerosis. *Genes Immun* **6**(2): 153-161.
- Karpus, W.J., Lukacs, N.W., McRae, B.L., Strieter, R.M., Kunkel, S.L., Miller, S.D. 1995. An important role for the chemokine macrophage inflammatory protein-1 alpha in the pathogenesis of the T cell-mediated autoimmune disease, experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* **155**(10): 5003-5010.

- Karpus, W.J., Kennedy, K.J. 1997. MIP-1alpha and MCP-1 differentially regulate acute and relapsing autoimmune encephalomyelitis as well as Th1/Th2 lymphocyte differentiation. *J Leukoc Biol.* **62**(5): 681-687.
- Kellar-Wood, H.F., Wood, N.W., Holmans, P., Clayton, D., Robertson, N., Compston, D.A. 1995. Multiple sclerosis and the HLA-D region: linkage and association studies. *Journal of Neuroimmunology* **58**: 183-190.
- Kennedy, K.J., Smith, W.S., Miller, S.D., Karpus, W.J. 1997. Induction of antigen-specific tolerance for the treatment of ongoing, relapsing autoimmune encephalomyelitis: a comparison between oral and peripheral tolerance. *J Immunol.* **159**(2): 1036-1044.
- Kieseier, B.C., Storch, M.K., Archelos, J.J., Martino, G., Hartung, H.P. 1999. Effector pathways in immune mediated central nervous system demyelination. *Curr Opin Neurol.* **12**(3): 323-336.
- Kioy, P.G. 2001. Emerging picture of multiple sclerosis in Kenya. *East Afr Med J* **78**: 93-96.
- Klaus 1979. Generation of memory cells. III. Antibody class requirements for the generation of B-memory cells by antigen-antibody complexes. *Immunology* 37:345-51).
- Konieczny, B.T., Dai, Z., Elwood, E.T., Saleem, S., Linsley, P.S., Baddoura, F.K., Larsen, C.P., Pearson, T.C., Lakkis, F.G. 1998. IFN-gamma is critical for long-term allograft survival induced by blocking the CD28 and CD40 ligand T cell costimulation pathways. *J Immunol.* **160**(5): 2059-2064.
- Kramer, E.M., Schardt, A., Nave, K. 2001. Membrane traffic in myelinating oligodendrocytes. *Microscopy Research and Techniques* **52**: 656-671.
- Kroepfl JF, Viise LR, Charron AJ, et al. (1996). "Investigation of myelin/oligodendrocyte glycoprotein membrane topology." *J Neurochem* **67**: 2219-2222.
- Krogsgaard, M., Wucherpfening, K.W., Canella, B., Hansen, B.E., Sveigaard, A., Pyrdol, J., Ditzel, H., Raine, C., Engberg, J., Fugger, L. 2000. Visualization of myelin

basic protein T cell epitopes in multiple sclerosis lesions using a monoclonal antibody specific for the human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DR2-MBP 85-95 complex. *Journal of Experimental Medicine* **191**: 1395-1412.

- Kurtzke, J.F., Beebe, G.W., Norman, J.E. Jr. 1979. Epidemiology of multiple sclerosis in U.S. veterans: 1. Race, sex, and geographic distribution. *Neurology* **29**: 1228–1235.
- Kurtzke, J.F. 1983. Epidemiology of multiple sclerosis. In *Multiple Sclerosis*, ed. JF Hallpike, CWM Adams, WW Tourtelotte, pp. 49-95. Baltimore, MD: Williams & Wilkins.
- Laes, M., Chao, B.H., Lin, L.H., Samiullah, M., Laursen, R.A. 1983. Amino acid sequence bovine white matter proteolipid. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **226**: 643-656.
- Lemaître, V. & D'Armiento, J. 2006. Matrix Metalloproteinases in Development and Disease *Birth Defects Research* **78**: 1-10.
- Leppert, D., Waubant, E., Galardy, R., et al. 1995. T-cell gelatinases mediate basement membrane transmigration in vitro. *J Immunol.* **154**(9): 4379– 4389.
- Li, J., Kokkola, R., Tabibzadeh, S., Yang, R., Ochani, M., Qiang, X., Harris, H.E., Czura, C.J., Wang, H., Ulloa, L., Wang, H., Warren, H.S., Moldawer, L.L, Fink, M.P., Andersson, U., Tracey, K.J., Yang, H. 2003. Structural Basis For The Proinflammatory Cytokine Activity Of High Mobility Group Box 1. *Molecular Medicine* 37- 45.
- Ligers, A., Xu, C. et al. 1999. The CTLA-4 gene is associated with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* **97**(1-2): 182-190.
- Lindert R, Haase CG, Brehm U, et al. 1999. “Multiple sclerosis: B and T-cell responses to the extracellular domain of the myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Brain* **122**: 2089-2099.
- Linington, C., Bradl, M., Lassmann, H., Brunner, C., Vass, K. 1988. Augmentation of demyelination in rat acute allergic encephalomyelitis by circulating mouse monoclonal antibodies directed against a myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *Am. J. Pathol.* **130**: 443–454.

- Litztenburger, T., Fassler, R., Bauer, J., Lassmann, H., Lington, C., Wekerle, H., Iglesias, A. 1998. B lymphocytes producing demyelinating autoantibodies: development and function in gene-targeted transgenic mice. *J Exp Med.* **188**(1): 169-180.
- Lou, Y.H., Park, K.K., Agersborg, S., Alard, P., Tung, K.S. 2000. Retargeting T cell mediated inflammation: a new perspective on autoantibody action. *J. Immunol.* **164**: 5251– 5257.
- Lublin, F.D. 2005. Clinical features and diagnosis of multiple sclerosis. *Neurol Clin* **23**(1): 1-15, v.
- Lutterotti, A., Reindl, M. et al. 2002. Antibody response to myelin oligodendrocyte glycoprotein and myelin basic protein depend on familial background and are partially associated with human leukocyte antigen alleles in multiplex families and sporadic multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* **131**(1-2): 201-207.
- Luster, A.D. 1998. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *The New England Journal of Medicine* **338**(7):436-45.
- Matesanz, F., Fedetz, M. et al. 2001. Allelic expression and interleukin-2 polymorphisms in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* **119**(1): 101-105.
- McDonald, I. 2001. Multiple sclerosis in its European matrix. *Multiple Sclerosis* **8**: 181-191.
- McManus, C., Berman, J.W., Brett, F.M., Staunton, H., Farrell, M., Brosnan, C.F. 1998. MCP-1, MCP-2 and MCP-3 expression in multiple sclerosis lesions: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *J Neuroimmunol.* **86**(1): 20-29.
- McQuibban, G.A., Gonq, J.H., Wong, J.P., Wallace, J.L., Clark-Lewis, I., Overall, C.M. 2002. Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant protein generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo *Blood* **100**(4): 1160-1107.
- Mead, R.J., Singhrao, S.K., Neal, J.W., Lassmann, H., Morgan, B.P. 2002. The membrane attack complex of complement causes severe demyelination associated with acute axonal injury. *J. Immunol.* **168**: 458–465.

- Modi, G., Mochan, A., Modi, M., Saffer, D. 2001. Demyelinating disorder of the central nervous system occurring in black South Africans. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **70**: 500–505.
- Murphy, P.M. et al. 1994. The molecular biology of leukocytes chemoattractant receptor. *Annu Rev Immunol* **12**: 593-633.
- Noseworthy, J.H., Lucchinetti, C., Rodriguez, M., et al. 2000. Multiple sclerosis. *N Engl J Med* **343**: 938-952.
- Oh, S.J., Calhoun, C.L. 1969. Multiple sclerosis in the Negro. *J Natl Med Assoc* **61**: 388–392.
- Oksenberg, J.R., Baranzini, S.E., Barcellos, L.F., Hauser, S. L. 2001. Multiple sclerosis: genomic rewards. *J. Neuroimmunol.* **113**: 171–184.
- Panitch, H.S., Hirsch, R.L., Schindler, J., Johnson, K.P. 1987. Treatment of multiple sclerosis with gamma interferon: exacerbations associated with activation of the immune system. *Neurology*.**37**(7): 1097-1102.
- Papais-Alvarenga, R.M., Miranda-Santos, C.M. et al. 2002. Optic neuromyelitis syndrome in Brazilian patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **73**(4): 429-435.
- Pease, J.E. 2006. Asthma, allergy and chemokines. *Current Drug Targets* **7**(1): 3-12.
- Pettinelli, C.B., McFarlin, D.E. 1981. Adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice after in vitro activation of lymph node cells by myelin basic protein: requirement for Lyt 1⁺ 2-T lymphocytes. *J. Immunol.* **127**: 1420-1423.
- Poser, C.M., Pat, D.W., Scheinberg, L., McDonald, W.I., Davis, F.A., Ebers, G.C., et al. 1983. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol* **13**: 227-231.
- Pouly, S., Antel, J.A. 1999. Multiple sclerosis and central nervous system demyelination. *Journal of Autoimmunity* **13**: 297-306.
- Prat, A. and Antel, J. 2005. Pathogenesis of multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol* **18**(3): 225-230.

- Probert L, Akassoglou K, Pasparakis M, Kontogeorgos G, Kollias G. 1995. Spontaneous inflammatory demyelinating disease in transgenic mice showing central nervous system-specific expression of tumor necrosis factor alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**(24): 11294-11298.
- Proost, P., Van Damme, J., Opdenakker, G. 1993. Leukocyte gelatinase B cleavage releases encephalitogens from human myelin basic protein. *Biochem Biophys Res Commun.* **192**(3): 1175–1181.
- Ransohoff, R.M., Kivisakk, P., Kidd, G. 2003. Three or more routes for lymphocyte migration into the nervous system. *Nature Reviews Immunology* **3**: 569-581.
- Reape, T.J., Groot, P.H. 1999. Chemokines and atherosclerosis. *Atherosclerosis* **147**(2): 213-325.
- Rebenko-Moll, N.M., Liu, L., Cardona, ^a, Ransohoff, R.M. 2006. Chemokines, mononuclear cells and the nervous system: heaven (or hell) is in the details. *Current Opinion in Immunology.* **18**: 683–689.
- Reindl, M., Linington, C. et al. 1999. Antibodies against the myelin oligodendrocyte glycoprotein and the myelin basic protein in multiple sclerosis and other neurological diseases: a comparative study. *Brain* **122** (Pt 11): 2047-2056.
- Rivera, V.M. 2005. Clinical characteristics of African Americans vs Caucasian Americans with multiple sclerosis. *Neurology* **64**(12): 2163.
- Rivers, T.M., Sprunt, D.H., Berry, G.P. 1933. Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. *J. Exp. Med* **58**: 39-53.
- Rodriguez, M., Lennon, V.A. 1990. Immunoglobulins promote remyelination in the central nervous system. *Ann. Neurol.* **27**: 12–17.
- Rosbo, N.K., Ben-Num, A. 1998. T-cell responses to myelin antigens in MS; relevance of the predominant autoimmune reactivity to myelin oligodendrocytes glycoprotein. *Journal of Autoimmunity* **11**: 287-299.
- Rosenberg, G.A., Kornfeld, M., Estrada, E., et al. 1992. TIMP-2 reduces proteolytic opening of blood-brain barrier by type IV collagenase. *Brain Res.* **576**(2):203–207.

- Rosenberg, G.^a, Cunningham, L.^a, Wallace, J., Alexander, S., Estrada, E.Y., Grossetete, M., Razhagi, ^a, Miller, K., Gearing, ^a. 2001. Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases in reperfusion injury to rat brain: activation of MMP-9 linked to stromelysin-1 and microglia in cell cultures. *Brain Res.* **893**(1-2): 104-112.
- Rosenberg, G.A. & Mun-Bryce. 2004. Matrix metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia *Ernst Schering Res Found Workshop* **47**: 1-16.
- Sadovnick, A.D., Ebers, G.C., Dymont, D.A., Risch, N.J. 1996. Evidence for genetic basis of multiple sclerosis. The Canadian Collaborative Study Group. *Lancet* **347**(9017): 1728-1730.
- Scaffidi, P., Misteli, T., Bianchi, M.E. 2002. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature.* **418**(6894): 191-195.
- Schluesener, H.J., Sobel, R.A., Linington, C., Weiner, H.L. 1987. A monoclonal antibody against a myelin oligodendrocyte glycoprotein induces relapses and demyelination in central nervous system autoimmune disease. *J. Immunol.* **139**: 4016–4021.
- Schmidt, S. 1999. Candidate autoantigens in Multiple Sclerosis. *Multiple Sclerosis* **5**: 147-160.
- Scolding, N. 2005. Devic's disease and autoantibodies. *Lancet Neurol* **4**(3): 136-137.
- Scolding, N., Franklin, R. 1998. Axon loss in multiple sclerosis. *Lancet* **352** (9125): 340-341.
- Seamons, A., Perchellet, A., Goverman, J. 2003. Immune tolerance to myelin proteins. *Immunol. Res.* **28**: 201-221.
- Sellebjerg, F., Sorensen, T.L. 2003. Chemokines and matrix metalloproteinase-9 in leukocyte recruitment to the central nervous system. *Brain Res Bull.* **61**(3): 347-355.
- Selmaj K, Raine CS, Cannella B, Brosnan CF. 1991. Identification of lymphotoxin and tumor necrosis factor in multiple sclerosis lesions. *J Clin Invest.* **87**(3): 949-954.

- Selmaj, K.W. 2000. Diseases of the central nervous system factor approach to inflammatory demyelinating Tumour necrosis factor and anti-tumour necrosis. *Ann. Rheum. Dis* **59**: 94-102.
- Sibley, W.A., Bamford, C.R., Clark, K. 1985. Clinical viral infections and multiple sclerosis. *Lancet* **1**: 1313-1315.
- Simpson, J.E., Newcombe, J., Cuzner, M.L., Woodrooffe, M.N. 1998. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and other beta-chemokines by resident glia and inflammatory cells in multiple sclerosis lesions. *Journal of Neuroimmunology* **84**(2): 238-249.
- Sharief, M.K., Thompson, E.J. 1991. The predictive value of intrathecal immunoglobulin synthesis and magnetic resonance imaging in acute isolated syndromes for subsequent development of multiple sclerosis. *Ann Neurol.* **29**(2): 147-151.
- Soldan, S.S., Alvarez Retuerto, A.I., Sicotte, N.L., Voskuhl, R.R. 2003. Immune modulation in multiple sclerosis patients treated with the pregnancy hormone estriol. *J Immunol.* **171**(11): 6267-3274.
- Sorensen, T.L., Sellebjerg, F., Jensen, C.V., Strieter, R.M., Ransohoff, R.M. 2001. Chemokines CXCL10 and CCL2: differential involvement in intrathecal inflammation in multiple sclerosis. *Eur J Neurol.* **8**(6): 665-672.
- Sorensen, P.S. 2005. Multiple sclerosis: pathophysiology revisited. *Lancet Neurol* **4**(1): 9-10.
- Sospedra, M. and Martin, R. 2005. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* **23**: 683-747.
- Spuler S, Yousry T, Scheller A, Voltz R, Holler E, Hartmann M, Wick M, Hohlfeld R. 1996. Multiple sclerosis: prospective analysis of TNF-alpha and 55 kDa TNF receptor in CSF and serum in correlation with clinical and MRI activity. *J Neuroimmunol.* **66** (1-2): 57-64.
- Stamatovic, S.M., Keep, R.F., Kunkel, S.L., Andjelkovic, A.V. 2003. Potential role of MCP-1 in endothelial cell tight junction 'opening': signaling via Rho and Rho kinase *Journal of Cell Science* **116**: 4615-4628.

- Stamatovic, S.M., Shakui, P., Keep, R.F., Moore, B.B. Kunkel, S.L., Van Rooijen, N., Andjelkovic, A.V. 2005. Monocyte chemoattractant protein-1 regulation of blood-brain barrier permeability. *Journal of cerebral blood flow and metabolism* **25**(5): 593-606.
- Stamatovic, S.M., Dimitrijevic, O.B., Andjelkovic, A.V. 2006. Inflammation and brain edema: New insights into the role of chemokines and their receptors *Acta neurochirurgica* **96**: 444-450.
- Sotgiu, S., Pugliatti, M., Sanna, ^a, Rosati, G. 2003. Does The “Hygiene Hypothesis” Provide An Explanation For The High Prevalence Of Multiple Sclerosis In Sardinia? *Autoimmunity* **36**(5): 257–260.
- Sotgiu, S., Pugliatti, M., Fois, M.L., Arru, G., Sanna, ^a, Sotgiu, M.^a, Rosati G. 2004. Genes, environment, and susceptibility to multiple sclerosis. *Neurobiology of Disease* **17**: 131– 143.
- Storch, M.K., Stefferl, A., Brehm, U., Weissert, R., Wallstrom, E., et al. 1998. Autoimmunity to myelin oligodendrocyte glycoprotein in rats mimics the spectrum of multiple sclerosis pathology. *Brain Pathol.* **8**: 681–694.
- Sun, J., Link, H., Olsson, T., Xiao, B.G., Andersson, G., et al. 1991. T and B cell responses to myelin-oligodendrocyte glycoprotein in multiple sclerosis. *J. Immunol.* **146**: 1490–1495.
- Suppiah, V., Alloza, I. et al. 2005. The CTLA4 +49 A/G*G-CT60*G haplotype is associated with susceptibility to multiple sclerosis in Flanders. *J Neuroimmunol* **164**(1-2): 148-153.
- Tanuma, N., Sakuma, H., Sasaki, A., Matsumoto, Y. 2006. Chemokine expression by astrocytes plays a role in microglia/macrophage activation and subsequent neurodegeneration in secondary progressive multiple sclerosis *Acta Neuropathologica* **112**(2): 195-204.
- Thelen, M. 2001. Dancing to the tune of chemokines. *Nature Immunology* **2**(2): 129-134.

- Tran, E.H., Prince, E.N., Owens, T. 2000. IFN-g Shapes Immune Invasion of the Central Nervous System Via Regulation of Chemokines. *The Journal of Immunology*. **164**: 2759–2768.
- Tsakadze, N.L., Sithu, S.D., Sem, U., English, W.R., Murphy, G., D'Souza, S.E. 2005. Tumor Necrosis Factor- α Converting Enzyme (TACE/ADAM-17) Mediates the Ectodomain Cleavage of Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1). *J Biol Chem*. **281**(6): 3157-3164.
- Uccelli, A., Aloisi, F. et al. 2005. Unveiling the enigma of the CNS as a B-cell fostering environment. *Trends Immunol* **26**(5): 254-259.
- Vandenbroeck K, Goris A. 2003. Cytokine gene polymorphisms in multifactorial diseases: gateways to novel targets for immunotherapy? *Trends Pharmacol Sci*. **24**(6): 284- 289.
- van der Laan, L.J., Ruuls, S.R., Weber, K.S., Lodder, I.J., Dopp, E.A., Dijkstra, D. 1996. Macrophage phagocytosis of myelin in vitro determined by flow cytometry: Phagocytosis is mediated by CR3 and induces production of tumor necrosis factor- α and nitric oxide. *J. Neuroimmunol*. **70**: 145–152.
- Veldhuis, W.B., Floris, S., Van der Meide, O.H., Voz, I.M.P., Vries, H.E., Dijkstra, C.D., Bar, P.R., Nicolay, K. 2003. Interferon-beta prevents cytokine induced neutrophil infiltration and attenuates blood-brain disruption. *J. Cerebral Blood Flow & Metabol* **23**: 1060-1069.
- Vercelli, D. 2004. Genetics, epigenetics, and the environment: switching, buffering, releasing. *J Allergy Clin Immunol* **113**(3): 381-386.
- van den Broek, H.H., Damoiseaux, J.G. et al. 2005. The influence of sex hormones on cytokines in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis: a review. *Mult Scler* **11**(3): 349-359.
- Vandenbroeck, K., Cunningham, S. et al. 2003. Polymorphisms in the interferon-gamma/interleukin-26 gene region contribute to sex bias in susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **48**(10): 2773-2778.

- Vandenberg, K. and Goris, A. 2003. Cytokine gene polymorphisms in multifactorial diseases: gateways to novel targets for immunotherapy? *Trends Pharmacol Sci* **24**(6): 284-289.
- van Oosten, B.W., Barkhof, F., Scholten, P.E., von Blomberg, B.M., Ader, H.J., Polman, C.H. 1998. Increased production of tumor necrosis factor alpha, and not of interferon gamma, preceding disease activity in patients with multiple sclerosis. *Arch Neurol*. **55**(6): 793-798.
- Villar, L.M., Sadaba, M. C. et al. 2005. Intrathecal synthesis of oligoclonal IgM against myelin lipids predicts an aggressive disease course in MS. *J Clin Invest* **115**(1): 187-194.
- Voskuhl, R.R., McFarlin, D.E., Stone, R., McFarland, H.F. 1993. T-lymphocyte recognition of a portion of myelin basic protein encoded by an exon expressed during myelination. *J Neuroimmunol*. **42**(2): 187-191.
- Xie, B., Dong, Z., Fidler, I.J. 1994. Regulatory mechanisms for the expression of type IV collagenases/gelatinases in murine macrophages. *J Immunol*. **152**(7): 3637-3644.
- Waldner, H., Collins, M., Kuchroo, V.K. 2004. Activation of antigen-presenting cells by microbial products breaks self tolerance and induces autoimmune disease. *J. Clin. Invest*. **113**: 990-997.
- Waksman, B.H., Porter H., Lees, M.D., Adams, R.D., Folch, J. 1954. A study of the chemical nature of components of bovine white matter effective in producing allergic encephalomyelitis in the rabbit. *J Exp Med*. **100**(5): 451-471.
- Wallin, M.T., Page, W.F., Kurtzke, J.F. 2004. Multiple sclerosis in US veterans of the Vietnam era and later military service: race, sex, and geography. *Ann Neurol* **55**: 65-71.
- Walsh, M.J., Tourtellotte, W.W. 1986. Temporal invariance and clonal uniformity of brain and cerebrospinal IgG, IgA, and IgM in multiple sclerosis. *J Exp Med*. **163**(1): 41-53.
- Weiner, H.L., Selkoe, D.J. 2002. Inflammation and therapeutic vaccination in CNS diseases. *Nature* **420**: 879-884.

- Weinshenker, B.G., Bass, B., Rice, G.P., Noseworthy, J., Carriere, W., Baskerville, J., and Ebers, G.C. 1989. The natural history of multiple sclerosis: geographically based study. Clinical Course and disability. *Brain* **112**: 133-146.
- Wergeland, S., Beiske, A. et al. 2005. IL-10 promoter haplotype influence on interferon treatment response in multiple sclerosis. *Eur J Neurol* **12**(3): 171-175.
- Wingerchuk, D.M., Lucchinetti, C.F., Noseworthy, J.H. 2001. Multiple sclerosis: Current Pathophysiological concepts. *Laboratory Investigation*. **81**(3): 263-281.
- Wong, B.R., Josien, R., Lee, S.Y., Sauter, B., Li, H.L., Steinman, R.M., Choi, Y. 1997. TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. *J Exp Med*. **186**(12): 2075-2080.
- Wucherpfennig, K.W., Catz, I., Hausmann, S., Strominger, J.L., Steinman, L., Warren, K.G. 1997. Recognition of the immunodominant myelin basic protein peptide by autoantibodies and HLA-DR2-restricted T cell clones from multiple sclerosis patients. Identity of key contact residues in the B-cell and T-cell epitopes. *J Clin Invest*. **100**(5): 1114-1122.
- Wujek, J.R., Bjartmar, C., Richer, E., Ransohoff, R.M., Yu, M., Tuohy, V.K., Trapp, B.D. 2002. Axon loss in the spinal cord determines permanent neurological disability in an animal model of multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*. **61**(1): 23-32.
- Zhou, H., Bernhard, E.J., Fox, F.E., Billings, P.C. 1993. Induction of metalloproteinase activity in human T-lymphocytes. *Biochim Biophys Acta*. **1177**(2): 174-178.
- Zipp, F., Weber, F., Huber, S., Sotgiu, S., Czlonkowska, ^a, Holler, E., Albert, E., Weiss, E.H., Wekerle, H., Hohlfeld, R. 1995. Genetic control of multiple sclerosis: increased production of lymphotoxin and tumor necrosis factor-alpha by HLA-DR2+ T cells. *Ann Neurol*. **38**(5): 723-730.
- Zipp, F., Windermuth, C., Pankow, H., Dichgans, J., Wienker, T., Martin, R., Muller, C. 2000. Multiple sclerosis associated aminoacids of polymorphic regions relevant for HLA binding are confined to HLA-DR2. *Human Immunology* **61**: 1021-1030.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)