



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO
GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO
INTEGRADO EM MEDICINA**

TELMA GAMEIRO

***ALTERAÇÕES IMUNOLÓGICAS NA ESCLEROSE
MÚLTIPLA E SUA CONTRIBUIÇÃO PARA O
CONHECIMENTO DA FISIOPATOLOGIA DA
DOENÇA***

ARTIGO DE REVISÃO

ÁREA CIENTÍFICA DE NEUROLOGIA

TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:

DRA. LÍVIA DIOGO SOUSA

DRA. SÓNIA MARQUES BATISTA

MARÇO/2012



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

2012

***ALTERAÇÕES IMUNOLÓGICAS NA ESCLEROSE MÚLTIPLA E SUA
CONTRIBUIÇÃO PARA O CONHECIMENTO DA FISIOPATOLOGIA
DA DOENÇA***

Artigo de Revisão

Autoria: Telma Gameiro

Estudante do 6º ano do Mestrado Integrado em Medicina da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Sob orientação científica de:

Dra. Lúcia Diogo Sousa - Chefe do Serviço de Neurologia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

Dra. Sónia Marques Batista - Interna do Internato Complementar em Neurologia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

AGRADECIMENTOS

Deixo um sincero e reconhecido agradecimento a todos os que contribuíram directa ou indirectamente para a realização deste trabalho.

Em particular, expresso a minha gratidão à Dra. Lúcia Diogo Sousa e à Dra Sónia Batista, pela disponibilidade e receptividade sempre demonstradas, pela motivação que me incutiram, e pelo esclarecimento de dúvidas e correcções científicas, essenciais na realização deste artigo de revisão.

Uma palavra de agradecimento, ainda à Dra. Helena Donato, pela formação no âmbito da metodologia, e disponibilidade para consultar as diversas bases de dados.

ÍNDICE

Glossário de siglas	1
Abstract.....	3
Resumo	5
Introdução	7
Métodos	10
Desenvolvimento	13
1. Inflamação versus Neurodegenerescência	13
2. Heterogeneidade Patológica da Esclerose Múltipla.....	15
3. Componentes na Imunofisiopatologia da Esclerose Múltipla.....	19
3.1. Linfócitos T	20
A. Linfócitos T CD4+	21
B. Linfócitos T CD8+	25
3.2. Linfócitos B.....	28
3.3. Imunidade Inata: Células Apresentadoras de Antígenos	33
4. Os Alvos das Respostas Linfocitárias: possíveis Antígenos.....	38
5. Alterações na Permeabilidade da Barreira Hemato-Encefálica	41
6. Imunofisiopatologia da Esclerose Múltipla	47
6.1. Fisiopatologia da Esclerose Múltipla: Hipótese Auto-Imune, Infecciosa e Degenerativa.....	48
6.2. Respostas Imunológicas na Esclerose Múltipla	51
7. Imunofisiopatologia da Esclerose Múltipla: Implicações Terapêuticas.....	55
Conclusão	59
Bibliografia.....	63
Anexo 1 - <i>Resumo das características dos artigos seleccionados</i>	74

GLOSSÁRIO DE SIGLAS

APC: Célula Apresentadora de Antígenos

BHE: Barreira hemato-encefálica

Células NK: Células *Natural Killer*

CNPase: Fosfodiesterase dos Nucleótidos cíclicos

DC: Célula Dendrítica

EBV: vírus Epstein-Barr

EM: Esclerose Múltipla

GM-CSF: Factor estimulador de colónias de Granulócitos e Macrófagos

IFN: Interferão

IL: Interleucina

LCR: Líquido Céfaló-Raquídeo

Linfócitos Th: Linfócitos T auxiliares

Linfócitos Treg: Linfócitos T reguladores

LPS: Lipopolissacarídeo

MAG: Glicoproteína associada à Mielina

MBP: Proteína Básica da Mielina

MHC: Moléculas de Histocompatibilidade

MMP: Metaloproteinases de matriz

MOBP: Proteína Básica Oligo-dendrocitária associada à Mielina

MOG: Glicoproteína Oligo-dendrocitária da Mielina

OSP: Glicoproteína específica Oligodendrocitária

PECAM-1: Molécula-1 de Adesão Celular Endotelial a Plaquetas

PLP: Proteína Proteolipídica

PNG: Proteoglicano

RM: Ressonância Magnética

SNC: Sistema Nervoso Central

TGF: Factor de transformação do crescimento (*Transforming Growth Factor*)

TNF: Factor de Necrose Tumoral

TWEAK: fraco indutor da apoptose semelhante ao TNF

VE-caderina: Endotélio Vascular-caderina

VEGF: Factor de Crescimento do Endotélio Vascular

ABSTRACT

Introduction: Multiple Sclerosis (MS) is an immune-mediated chronic disorder of central nervous system (CNS) described as an inflammatory process with demyelination, along with neurodegeneration and gliosis. Histopathological features suggest a role for CNS resident cells, innate immune system, and adaptive immune migratory cells.

Objective: To identify innate and adaptive immune system elements involved on MS etiopathogenesis; to clarify the role of these cells and molecules on the onset and progression of the disease; and finally, to describe putative immunopathogenic mechanisms.

Development: The majority of studies suggest that active demyelination in MS involves an inflammatory reaction with increased T and B cells, particularly in perivascular cuffs. Changes in CD4⁺ T cells phenotypes have been noticed, especially in Th1, Th17 and Treg. Th1 and Th17, both pro-inflammatory, are largely expanded and related to more severe disease activity. They induce IFN- γ and TNF- α production, which mediate activation of effector cells, chemotaxis, and disruption in Blood Brain Barrier (BBB). In contrast, Treg cells protective anti-inflammatory activity is suppressed due to their decreased levels or dysfunctional responses. The CNS resident cells, as potential class I MHC presenting molecules are susceptible to CD8⁺ T cells cytotoxic action in active lesions, where they exceed CD4⁺ T cells. B cells are involved in several processes, including antigenic presentation, effector T cell activation and antibody production/opsonization (of possible myelinic or non-myelinic antigens). In some Secondary Progressive MS patients meningeal lymphoid follicle-like structures have been reported, and are related to more severe disease. Innate immunity mediates

antigenic presentation and generates a pro-inflammatory milieu. All of these changes happen in presence of a disrupted BBB. MS physiopathological mechanisms may involve B and T cell peripheral activation and their traffic across a BBB with an improper permeability. In CNS, innate and acquired immune systems may interact and cooperate in the generation of pro-inflammatory responses that trigger demyelination and also, axonal degeneration.

Conclusion: MS physiopathology proves to be a complex process where several peripheral or CNS resident innate and acquired immune systems elements operate. The Knowledge about imunopathogenic mechanisms has a therapeutic impact, because it leads to the development of strategies that target and modify the pathology, and eventually to select biomarkers.

Keywords: Multiple sclerosis; immunology; physiopathology; inflammation;

RESUMO

Introdução: A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença crónica do Sistema Nervoso Central (SNC) imunomediada, que se caracteriza por um processo de inflamação e desmielinização, associados a neurodegenerescência e gliose. As alterações histopatológicas tipicamente descritas sugerem o envolvimento das células residentes do SNC, da imunidade inata, bem como das células migratórias da imunidade adaptativa.

Objectivos: Identificar os componentes do sistema imune inato e adquirido, implicados na etiopatogénese da EM; procurar esclarecer o papel destas células e moléculas no início e progressão da doença; e por fim, apresentar mecanismos imunopatogénicos putativos.

Desenvolvimento: A maioria dos estudos sugerem que o processo de desmielinização activa na EM envolve uma reacção inflamatória com acumulação de linfócitos T e B, particularmente perivascular. Foram observadas alterações em determinados fenótipos de linfócitos T CD4⁺, particularmente os Th1, Th17 e Treg. Os dois primeiros, de carácter pró-inflamatório apresentam-se amplamente expandidos e correlacionam-se com maior grau de actividade da doença. Induzem a produção de IFN- γ e TNF- α , envolvidos em processos de activação de células efectoras, quimiotaxia, e alterações na permeabilidade da Barreira Hemato-Encefálica (BHE). Os linfócitos Treg pelo contrário estão reduzidos ou disfuncionais, estando suprimidas as suas propriedades protectoras anti-inflamatórias. As células residentes no SNC, como potenciais apresentadoras de moléculas de MHC de classe I, são susceptíveis à acção citotóxica dos linfócitos T CD8⁺ presentes nas lesões activas, que predominam sobre os linfócitos T CD4⁺. Os linfócitos B estão envolvidos em diversos processos, nomeadamente, apresentação antigénica e activação de linhas efectoras de linfócitos T,

produção de anticorpos/opsonização (de eventuais antígenos mielínicos ou não mielínicos). Em doentes com EM Secundariamente Progressiva observam-se por vezes estruturas semelhantes a folículos linfóides de localização meníngea, relacionadas com maior gravidade da doença. A imunidade inata intervém na apresentação antigénica e criação de ambiente pró-inflamatório. As alterações atrás descritas ocorrem na presença de uma BHE com permeabilidade aumentada. Os mecanismos fisiopatológicos propostos para explicar a EM envolvem a activação periférica de Linfócitos T e B, e migração destes através de uma BHE inadequadamente permeável. No SNC, imunidade inata e adquirida interagem e conjugam respostas pró-inflamatórias que fomentam a desmielinização e adicionalmente, degenerescência axonal.

Conclusão: A fisiopatologia da EM demonstra ser um complexo processo onde operam diversos elementos do sistema imune inato e adquirido, de origem periférica e residentes no SNC. O conhecimento dos mecanismos imunopatogénicos tem impacto terapêutico, no desenvolvimento de estratégias orientadas e modificadoras da doença, e eventualmente de biomarcadores.

Palavras-chave: Esclerose Múltipla; Imunologia; Fisiopatologia; Inflamação.

INTRODUÇÃO

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença crónica do Sistema Nervoso Central (SNC) imunomediada, que se caracteriza por um processo de inflamação e desmielinização, associados a neurodegenerescência e gliose. Apresenta um amplo espectro clínico condicionado pela localização das lesões, que pode incluir desde défices sensoriais, a motores, autonómicos e/ou de funções neurocognitivas (Sospedra *et al.*, 2005).

Apesar de a etiologia permanecer ainda desconhecida, a teoria que actualmente reúne mais consenso propõe que em indivíduos geneticamente predispostos e com uma tolerância imunológica anómala, determinados factores ambientais desregularão o sistema imunitário (Stadelmann, 2011). Na maioria dos doentes com EM, a fase inicial da doença ocorre com períodos de exacerbação alternados com remissão parcial ou “total” dos sintomas (Fig. 1). As lesões encontradas a nível do SNC têm características compatíveis com um processo inflamatório, com edema localizado e desmielinização envolvendo predominantemente a substância branca, e associam-se a alterações da permeabilidade da barreira hemato-encefálica (Hemmer *et al.*, 2002). O infiltrado inflamatório destas lesões desmielinizantes agudas é composto por macrófagos, repletos de lípidos e restos mielínicos, por monócitos, linfócitos e astrócitos (Minagar *et al.*, 2003). Por vezes, pode observar-se ainda destruição e perda de axónios (Minagar *et al.*, 2003). A tendência nestes casos é para, tardiamente evoluírem para uma forma secundariamente progressiva, sem recuperação após os surtos e com progressão da incapacidade neurológica no intervalo dos surtos, possivelmente na sequência de perda irreversível da reserva de capacidade funcional neuronal (Stadelmann, 2011). Em cerca de 10% dos doentes, a evolução é progressiva desde início (forma primária progressiva), sem exacerbações evidentes.

Sistema Imunitário e Evolução da Doença na EM

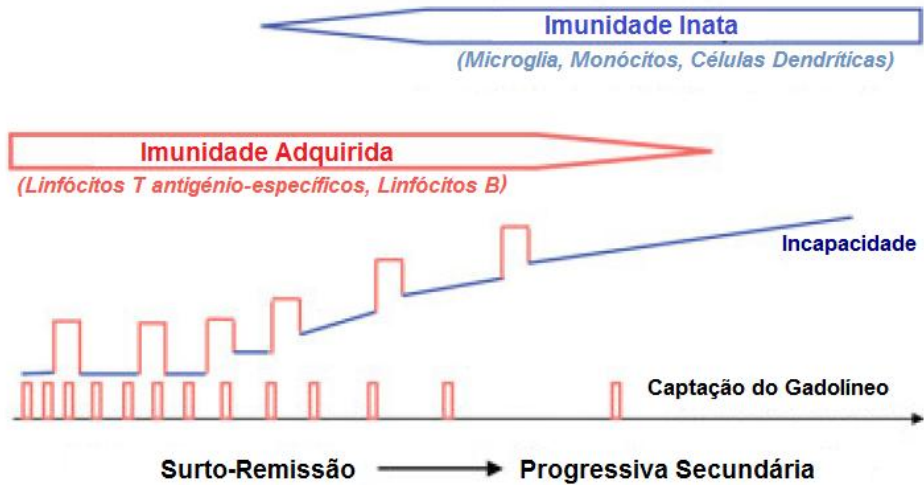


Figura 1 – Sistema Imunitário e evolução da Esclerose Múltipla. A EM, geralmente, surge sob a forma de Surto-Remissão que evolui para a forma secundariamente Progressiva. Associa-se a primeira, a uma disfunção da Imunidade Adquirida, e a segunda, parece ser conduzida pela Imunidade Inata. (Adaptado de Weiner, 2009)

OBJECTIVOS

Neste trabalho pretende-se analisar a fase inflamatória da EM, identificando as alterações imunológicas presentes ao nível da imunidade inata e adquirida, os respectivos elementos implicados, e o seu contributo para a fisiopatologia da doença. Pretende-se compreender de que forma os componentes do sistema imune se articulam e interagem entre si, e analisar as respostas que daí resultam.

O conhecimento dos mecanismos subjacentes ao desenvolvimento desta patologia permite definir e desenvolver estratégias terapêuticas orientadas e mais eficazes, com repercussão na progressão da doença, impedindo ou reparando a deterioração subjacente.

MÉTODOS

Esta revisão assentou numa pesquisa bibliográfica usando como referência o modelo dos 5 S de Haynes, representado por uma pirâmide que organiza os diferentes modelos de bases de dados hierarquicamente.

Os *Systems* não foram incluídos na pesquisa, uma vez que ainda não estão completamente desenvolvidos.

No que respeita aos *Summaries*, foram consultadas as seguintes fontes de informação: Uptodate e Dynamed. A pesquisa no Uptodate foi realizada com as seguintes palavras-chave: “multiple sclerosis immunology physiopathology”. Os dois documentos encontrados não continham informação relevante para este trabalho. A pesquisa na *Dynamed*, utilizando as mesmas palavras-chave não obteve resultados.

Ao nível das *Synopses*, foram consultados o ACP Journal Club e a Evidence Based Medicine. Com as palavras-chave “multiple sclerosis immunology physiopathology” no ACP Journal Club não foram encontrados artigos individuais ou revisões sistemáticas. Na Evidence Based Medicine, com as mesmas palavras-chave, mas limitando a pesquisa às publicações de 2000 até à actualidade, obtiveram-se 345 documentos. No entanto, após verificação dos mesmos, foi constatado que nenhum deles se adequava aos objectivos deste trabalho.

Relativamente às *Syntheses*, foi conferida a Cochrane Library. Utilizando como palavras-chave “multiple sclerosis immunology physiopathology” obtiveram-se zero revisões sistemáticas. Reduzindo as palavras-chave a “multiple sclerosis immunology”, foram encontradas duas revisões sistemáticas não relevantes para este trabalho. Uma terceira tentativa utilizou como palavras-chave “multiple sclerosis physiopathology”, mas não foram encontradas revisões sistemáticas.

Finalmente, na base da pirâmide, ao nível dos *Studies*, foi usado o interface de pesquisa Pubmed. Aplicando o filtro das “Clinical Queries”, no âmbito das revisões sistemáticas, meta-análises, consensos e guidelines, com as palavras-chave: [“multiple sclerosis” AND (immunology or immunological)] obtiveram-se 94 documentos; com [“multiple sclerosis” AND (physiopathology or physiopathological)] foram obtidos 19 documentos. Ainda na Pubmed foi efectuada pesquisa utilizando o Medical Subject Headings (MeSH), limitando a pesquisa a estudos Humanos, publicados desde 2000 até à actualidade, em inglês, português ou espanhol. Aplicando as palavras-chave “multiple sclerosis” juntando o qualificador “immunology” obtiveram-se 1759 documentos; adicionalmente juntou-se outro qualificador “physiopathology”, que reduziu os resultados anteriores para 240. Para abranger os artigos ainda não cobertos pelos termos MeSH, foi realizada pesquisa em texto livre com as seguintes palavras-chave: [“multiple sclerosis” AND (immunology AND physiopathology)], sem resultados encontrados.

Relativamente aos artigos sugeridos na pesquisa realizada na Pubmed, foram excluídos os que não apresentavam informação relevante para atingir os objectivos deste trabalho. Na selecção das referências bibliográficas foram preferidos os estudos em humanos, para uma melhor compreensão da sua complexidade imunológica, uma vez que a extrapolação dos resultados de modelos experimentais em animais não é sempre a mais semelhante, condicionando insucesso em futuras estratégias terapêuticas direccionadas para estes alvos. Seleccionaram-se, sempre que disponíveis, os estudos mais recentes. Quer a escolha, quer a interpretação dos resultados, tiveram em consideração o tamanho e a representatividade da amostra, e quando aplicável, a metodologia.

Adicionalmente foi necessário aceder a 11 artigos científicos mais antigos, e portanto não abrangidos na pesquisa acima descrita, por apresentarem informação fundamental, no âmbito deste trabalho de revisão.

A tabela apresentada no Anexo 1 resume as características da bibliografia que suporta esta revisão. Foram seleccionados 85 artigos, 27 de revisão e 58 científicos. Quanto aos artigos científicos, 31 eram casos-controlo, 3 eram ensaios clínicos de fármacos, 3 eram de coorte, 19 eram de investigação experimental e 2 eram séries de casos.

DESENVOLVIMENTO

1. INFLAMAÇÃO versus NEURODEGENERESCÊNCIA

A fisiopatologia da EM parece incluir um componente inflamatório e outro neurodegenerativo, não sendo consensuais as suas relações temporal e causal (DeAngelis *et al.* 2008). Para a maioria dos autores trata-se de uma doença primariamente inflamatória que condiciona ao longo do tempo um processo de neurodegenerescência; outros autores, pelo contrário, advogam que é uma doença neurodegenerativa primária com resposta inflamatória consequente (Stadelmann, 2011).

A fase inflamatória, demonstrada inequivocamente no estudo histopatológico das lesões, traduz-se clinicamente pelos surtos, e imagiologicamente por lesões activas captantes de contraste. Inversamente, o componente neurodegenerativo manifesta-se clinicamente por acumulação progressiva de incapacidade neurológica na ausência de surtos relevantes e, adicionalmente, na Ressonância Magnética a presença de atrofia cerebral sem a existência de placas ativas.

A eficácia das terapêuticas actualmente disponíveis e que interferem com o processo inflamatório - anti-inflamatórios/imunomoduladores -, únicas que demonstraram ser capazes de modificar o curso clínico da Esclerose Múltipla, constitui um argumento irrefutável a favor da importância do componente inflamatório na fisiopatologia da doença. Porém, a sua ineficácia na fase progressiva destaca a neurodegenerescência como mecanismo primordial na progressão da doença e acumulação da incapacidade neurológica.

Esta dualidade da fisiopatologia da doença deverá condicionar futuramente o desenvolvimento e selecção individualizada de estratégias terapêuticas: se o processo dominante for inflamatório, dever-se-á apostar em anti-

inflamatórios/imunomoduladores; se por outro lado, prevalecer a neurodegenerescência, será mais eficaz adoptar estratégias neuroprotetoras.

2. HETEROGENEIDADE PATOLÓGICA DA ESCLEROSE MÚLTIPLA

A Esclerose Múltipla distingue-se pela sua heterogeneidade, quer interindividual, quer ao longo do seu desenvolvimento num mesmo paciente, aparentemente com alvos e mecanismos fisiopatológicos desiguais. Com base nos resultados de biópsias cerebrais e autópsias, Lucchinetti *et al.* (2000) descreveram a existência de quatro padrões histopatológicos, atendendo à perda de proteínas mielínicas, à localização e extensão das placas, aos padrões de destruição de oligodendrócitos e à evidência imunopatológica de activação do complemento (Tabela 1).

Em comum, os diferentes padrões histopatológicos apresentam infiltrados inflamatórios compostos por linfócitos T e macrófagos. Os Tipos I e II, mais frequentes, assemelham-se à Encefalomielite Aguda Disseminada mediada por linfócitos T ou mediada por linfócitos T e anticorpos; por outro lado, as características dos Tipos III e IV são idênticas às da Distrofia Primária de Oligodendrócitos ou da desmielinização induzida por toxinas ou vírus.

Tabela 1 – Características estruturais e imunológicas dos quatro padrões de lesão activa de doentes com Esclerose Múltipla. (Adaptado de Lucchinetti *et al.*, 2000)

	<u>Padrão I</u>	<u>Padrão II</u>	<u>Padrão III</u>	<u>Padrão IV</u>
Composição do infiltrado				
Linf T CD3	++	++	++	++
Plasmócitos	+	+	+	±
Macrófagos	+++	++	++	+++
C9neo	-	++	-	-
Desmielinização				
Padrão peri-venoso	+	+	-	+/-
Bordos da placa	Nítidos	Nítidos	Mal definidos	Nítidos
Padrão concêntrico	-	-	+	-
Oligodendrócitos (OG)				
Densidade de OG	+++	++	+/-	+/-
DNA fragmentado (OG)	+/-	+/-	++ PA	++ SBPP
Apoptose de OG	-	-	+	-
Perda prot. mielínicas	=	=	>MAG	=
Remielinização				
Placas sombra	++	++	-	-

Relativamente aos dois primeiros padrões, há evidência de alteração da permeabilidade da BHE, predominando no Tipo I, linfócitos e macrófagos, sendo o Tipo II, marcado pelo depósito de anticorpos e complemento.

No Tipo III, as lesões activas apresentam bordos mal definidos, com infiltração difusa da substância branca adjacente, e alternância de lâminas mielinizadas e desmielinizadas na periferia. A desmielinização, ao contrário do que sucede nos padrões anteriores, não se dispõe em redor dos vasos inflamados e parece ser induzida por perturbações funcionais nos oligodendrócitos. Este padrão predominantemente degenerativo foi reconhecido numa fase precoce de alguns doentes, não tendo sido possível apurar, neste estudo, se se trata de um padrão distinto e contínuo ao longo da evolução da doença, ou por outro lado, se consiste na lesão inicial, que posteriormente evolui para os Tipos I ou II, que são mais comuns. O Tipo IV é característico da Esclerose Múltipla Primariamente Progressiva.

Desconhece-se por que razão se desenvolvem os quatro padrões de desmielinização atrás descritos. A especulação em torno desta questão aponta alguns factores possivelmente envolvidos, nomeadamente o tempo de evolução das lesões, a severidade do agente indutor, a presença/tipo de lesões prévias na área de desmielinização activa, ou mesmo a suscetibilidade do doente. Outra dúvida pertinente relaciona-se com a persistência ou não destes padrões histopatológicos ao longo do curso da doença, particularmente quando transita para a cronicidade. As respostas a estas questões têm implicações terapêuticas, pois esta marcada heterogeneidade sugere a necessidade de uma adequação do tratamento ao respetivo padrão.

Outro estudo, de Breij *et al.* (2008), com material de autópsia de indivíduos com EM já estabelecida, salienta a tendência para a homogeneidade à medida que se evoluiu para a cronicidade, sugerindo que a heterogeneidade da imunologia das lesões numa fase

inicial do desenvolvimento da doença deverá convergir no sentido de um mecanismo de desmielinização comum. Estes autores destacam as diferenças na composição do infiltrado inflamatório na fase aguda e na fase crónica: na primeira, geralmente, há perda de proteínas mielínicas como a MAG e lesões tipo hipóxico-isquémica; enquanto na segunda predomina a deposição de anticorpos e complemento, não se observando apoptose de oligodendrócitos.

3. COMPONENTES NA IMUNOFISIOPATOLOGIA DA ESCLEROSE MÚLTIPLA

O conhecimento existente relativo aos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na doença e que têm conduzido ao desenvolvimento de estratégias terapêuticas, resulta de estudos *in vitro*, resultados de autópsias, ensaios clínicos, e também de estudos em modelos animais experimentais, como a Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE). Este modelo em particular, consiste na imunização de animais com proteínas derivadas da mielina do SNC, e permite reproduzir características clínicas e neuropatológicas (desmielinização inflamatória) semelhantes à EM. Estas manifestações são igualmente mimetizadas quando é feita a transferência de linfócitos T CD4⁺, de animais com EAE, activados e reactivos contra a mielina (Bar-Or, 2008). O fenótipo depende do fundo genético, do antigénio seleccionado e do esquema de imunização. O mecanismo fisiopatológico a destacar na EAE tem como protagonistas os linfócitos T CD4⁺ e, por esta razão, durante algum tempo foi aceite um papel de relevo destas células na patogénese da EM, como mediadores de autoimunidade. No entanto, há diferenças fisiopatológicas importantes entre ambos que justificam a ausência de eficácia de alguns tratamentos que obtiveram resultados promissores na EAE. Tal facto incentivou a pesquisa de outros agentes celulares mediadores e mecanismos possíveis.

Actualmente reconhece-se o contributo de diversas células e moléculas como linfócitos T CD4⁺, em particular os produtores de Interleucina 17, linfócitos T CD8⁺, linfócitos B, e linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ reguladores, bem como a intervenção da imunidade inata (Fig. 1).

O nível de actividade da doença e a lesão neurológica estão directamente relacionados com a quantidade de linfócitos T, e em menor grau com a de linfócitos B. (Frischer *et al.*, 2009)

3.1. LINFÓCITOS T

A activação de Linfócitos T implica a ligação do antígeno exposto pelo complexo MHC da Célula Apresentadora de Antígenos (Célula Dendrítica, Monócitos/Macrófagos, Linfócitos B e/ou Células da Microglia), ao respectivo receptor (TCR). No entanto, para que a activação seja eficaz é necessária a intervenção de moléculas co-estimuladoras, como a CD28, e complementarmente, a CD80 (B7-1) e a CD86 (B7-2), ambas expressas por APCs, que intervêm na activação de linfócitos T auxiliares (Th). O CD28 (B7-1 e B7-2) e o ICOS participam na ativação de linfócitos Th17 (Park *et al.*, 2005). Posteriormente, os linfócitos T estão aptos a proliferar, segregar citocinas e/ou outras moléculas efectoras (mediante a sua diferenciação), ou adquirir capacidade citotóxica. O mecanismo de actuação poderá envolver um ataque directo ou a modulação da acção de outras células ou moléculas.

A mobilização de linfócitos T para o SNC parece ser estimulada na presença de células cerebrais danificadas, apesar de se desconhecer o mecanismo subjacente (Neumann *et al.*, 2002).

Estudos histopatológicos confirmam a sua presença nas placas desmielinizadas activas. Recentemente, utilizando material de autópsia, Frischer *et al.* (2009) identificaram estas células, também em lesões no estadio progressivo da EM, na chamada “substância branca aparentemente normal”, em lesões inactivas e nas meninges. Os linfócitos T encontram-se nas regiões perivasculares, em particular mas não exclusivamente, nas placas activas ou bordos activos de lesões crónicas e, predominam no estadio de surto-remissão (Tzartos *et al.*, 2008). Importa sublinhar que, de um modo geral, a quantidade de células inflamatórias é mais acentuada nas placas desmielinizantes activas, em relação ao restante tecido infiltrado. Este estudo, confirma ainda, que o rácio entre linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ favorece os segundos (Lassmann,

1999). No entanto, a proporção entre linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ não é unânime entre autores, o que pode dever-se às respectivas localizações preferenciais: enquanto os primeiros predominam nos espaços peri-vasculares e meninges, os segundos são encontrados nos espaços peri-vasculares e parênquima. (Tzartos, *et al.*, 2008)

A. Linfócitos T CD4⁺

Os linfócitos T CD4⁺ diferenciam-se segundo diferentes fenótipos, de acordo com a interação com o antígeno, com o complexo MHC de classe II, com moléculas co-estimuladoras, e com a exposição a determinados perfis de citocinas do ambiente em que estão inseridos. A resposta gerada estará em concordância com essa transformação (Fig. 2).

Estudos recentes apontam para um acção inibitória do TGF- β na diferenciação em linhas efectoras, como Th1, Th2 e Th17, em humanos (Acosta-Rodriguez *et al.*, 2007), apesar de em estudos *in vitro* apenas inibir as duas primeiras. (Veldhoen *et al.*, 2006)

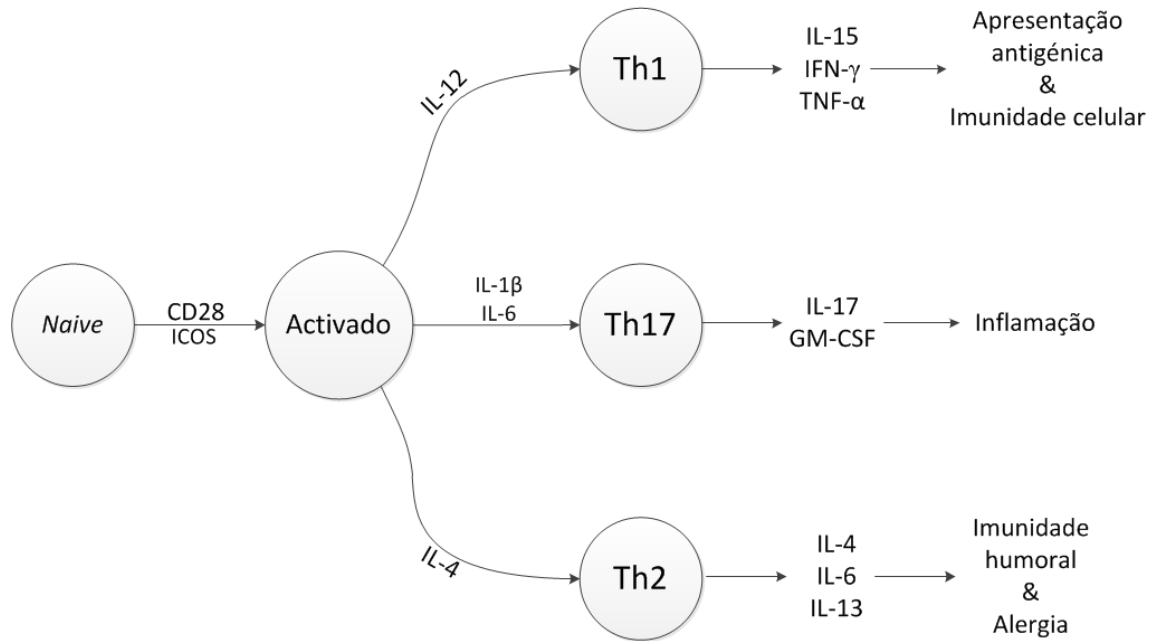


Figura 2 - Diferenciação de linfócitos T CD4⁺ em linhas efectoras.

A diferenciação em Linfócitos Th1, que participam na imunidade celular, envolve a presença de IL-12 (produzida por APCs activadas), com posterior formação de IL-15, IFN- γ e TNF- α , todos de natureza inflamatória. Estas, presentes em níveis elevados no plasma de doentes com EM, são responsáveis pelo recrutamento e activação de células imunes, e pela indução da apoptose de oligodendrócitos. (Kasper & Shoemaker, 2010) O IFN- γ , produzido em resposta a antígenos mielínicos (PLP e MBP), está associado a evidência de agravamento da doença em estudos *in vitro*, e já foi demonstrado que o tratamento da EM com esta molécula, induz exacerbação clínica (Moldovan *et al.*, 2003). Além dos efeitos anteriormente mencionados, está demonstrado que o IFN- γ interfere com a BHE, aumentando a sua permeabilidade. (Minagar *et al.*, 2003)

Os linfócitos Th2, por outro lado, requerem a presença de IL-4 para se converterem neste fenótipo, que regula a imunidade humoral, e irão produzir IL-4, IL-6 e IL-13 (Kasper & Shoemaker, 2010). O desenvolvimento deste fenótipo é inibido pelo INF- γ ,

em modelos animais (Veldhoen *et al.*, 2006). Skapenko *et al.*, 2004, demonstrou através da indução de respostas Th1 de células humanas em modelos animais que a IL-4 tem uma acção inibitória directa sobre a diferenciação e activação de linfócitos Th1. As respostas Th2 podem contribuir para danificar os tecidos na EM, e sob determinadas circunstâncias, verificou-se que são capazes de induzir EAE (Sospedra *et al.*, 2005).

Os linfócitos Treg (CD4⁺ CD25⁺) são responsáveis pela tolerância imunológica periférica, ao prevenir a activação e as funções efectoras de linfócitos T. Resultam da exposição a TGF-β e ácido retinóico, e expressão da proteína nuclear FoxP3; irão segregar IL-10 e TGF-β, que desempenham um papel supressor regulador, como foi evidenciado nos modelos de EAE. (Kasper & Shoemaker, 2010; Veldhoen *et al.*, 2006)

Tzartos *et al* (2008) não detetaram linfócitos Treg FosP3⁺ em lesões activas, inactivas, nem mesmo nos controlos, o que sugere uma ausência da modulação supressora destas células sobre os homólogos efectores no SNC. Importa referir que estas células são identificadas no sangue periférico destes doentes, mas com uma redução significativa da sua funcionalidade. (Viglietta *et al.*, 2004). No entanto, encontraram-se níveis elevados de IL-10 durante a fase de remissão, o que aponta para uma função supressora sobre as respostas imunitárias (Correale *et al.*, 1995), direccionada particularmente para as respostas efectoras Th1, evitando a produção das respectivas citocinas pro-inflamatórias como o IFN-γ. (Skapenko *et al.* 2004) São ainda referidas propriedades protectoras ao nível da integridade da BHE (Minagar & Alexander, 2003).

A diferenciação em linfócitos Th17, nos humanos, resulta da acção de IL-1β, potenciada pela IL-6, sobre linfócitos T auxiliares “naive”; produzem IL-17 o que lhes confere esta designação, e também GM-CSF (Factor estimulador de colónias de Granulócitos e Macrófagos), que têm propriedades pro-inflamatórias, como já foi

demonstrado em diversos estudos (Park *et al.*, 2005; Veldhoen *et al.*, 2006; Kasper & Shoemaker, 2010). A IL-23, que se julgava participante no processo de diferenciação, não é indispensável neste processo, assegurando no entanto, a sobrevivência e expansão dos linfócitos Th17 (Veldhoen *et al.*, 2006). Contrariamente, em estudos *in vivo* e *in vitro*, as citocinas dos fenótipos Th1 e Th2 como a IL-12, o IFN- γ e a IL-4, parecem reduzir a expressão de IL-17 e o desenvolvimento de linfócitos Th17 (Park *et al.*, 2005). Um estudo de caso-controlo, com amostras de tecido cerebral humano realizado por Tzartos *et al.* (2008), enfatizou o papel da IL-17 na patogénese da EM. Esta citocina foi identificada em linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ nos astrócitos e oligodendrócitos em regiões de doença activa. Verificou-se que os linfócitos produtores de IL-17 estão relacionados com maior actividade nas lesões de EM, uma vez que predominam de forma significativa, nas placas ativas e nos bordos ativos das crónicas, em relação às zonas inativas, substância branca aparentemente normal e controlos. A sua presença, nas lesões activas e crónicas activas, sugere a sua intervenção nos processos iniciais e na persistência do processo inflamatório. O microambiente gerado nestas regiões é propício à polarização para Th17: as células dendríticas e os macrófagos/microglia expressam IL-23, e lesões ou inflamação do SNC induzem a secreção de IL-6 e IL-1 β pelos astrócitos. (Tzartos, *et al.*, 2008)

Weiner (2008) afirma que a amplitude do envolvimento dos linfócitos Th17 pode servir como indicador da gravidade da EM, com a maior gravidade relacionada com a IL-17 e a menor com o INF- γ .

De um modo geral, Minagar & Alexander (2003) concluem que deverá ocorrer um ataque ao complexo mielina-oligodendrócito, mediado por Linfócitos T CD4⁺ e respetivos receptores (TLR), em interação com antígenos mielínicos apresentados por

MHC de classe II, expressos por macrófagos/microglia, astrócitos e células endoteliais cerebrais.

B. Linfócitos T CD8⁺

Os linfócitos T CD8⁺ adquirem um fenótipo efector quando reconhecem um antígeno, na presença de moléculas MHC de classe I, em células apresentadoras de antígenos, co-adjuvado por moléculas co-estimuladoras (CD28-B7), sob influência de citocinas inflamatórias. No seu conjunto, estes factores irão determinar a activação, proliferação e diferenciação particular do linfócito T CD8⁺, que pode apresentar vários padrões de comportamento e tropismo. A sua acção engloba respostas citotóxicas e não citotóxicas, que podem envolver moléculas como a granzima B e perforinas (citotoxicidade por contacto directo), o Fas e o seu ligando (indução de apoptose), ou pela secreção de citocinas pro-inflamatórias, IFN- γ e TNF- α (fomenta a inflamação local). (Saxena *et al.*, 2011)

A expressão de moléculas MHC de classe I, apesar de não ser habitual nas células neuronais do parênquima de cérebros saudáveis, pode ser induzida *de novo* durante os processos inflamatórios ou degenerativos que acometem o SNC, pelos próprios linfócitos T CD8⁺, que libertam citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e TNF- α . O facto de a maioria das células residentes do SNC, como astrócitos, oligodendrócitos e neurónios, terem a capacidade de expressar moléculas de MHC classe I torna-as susceptíveis à agressão por parte dos linfócitos T citotóxicos. Porém, o grau de susceptibilidade e o mecanismo aplicado variam com o tipo de célula alvo e o processo inflamatório subjacente. (Neumann, *et al.*, 2002)

Os linfócitos T CD8⁺ fazem parte do infiltrado inflamatório linfocitário nos espaços peri-vasculares e das lesões parenquimatosas de EM, predominando sobre os linfócitos T CD4⁺ (Tzartos *et al.*, 2008; Frischer *et al.*, 2009). Como referido anteriormente, mediante os estímulos apropriados, podem tornar-se produtores de IL-17, com as respectivas repercussões inflamatórias, estando relacionados com a fase activa da EM (Tzartos *et al.*, 2008).

Jacobsen *et al.* (2002) demonstraram no seu estudo, que a expansão de linfócitos T CD8⁺ no LCR dos doentes é comum na EM e que a sua expansão parece estabilizar com o tempo, em cada doente. Concluíram ainda que pelo menos em alguns doentes, a expansão destas células é clonal ou oligoclonal.

Foram observados, como mostra na Figura 3, linfócitos T citotóxicos que expressavam granzima B, na proximidade de neurónios danificados, em lesões desmielinizantes activas. A agressão directa citotóxica era sugerida pela aparente polarização dos grânulos citotóxicos contra os axónios. (Neumann, *et al.*, 2002)

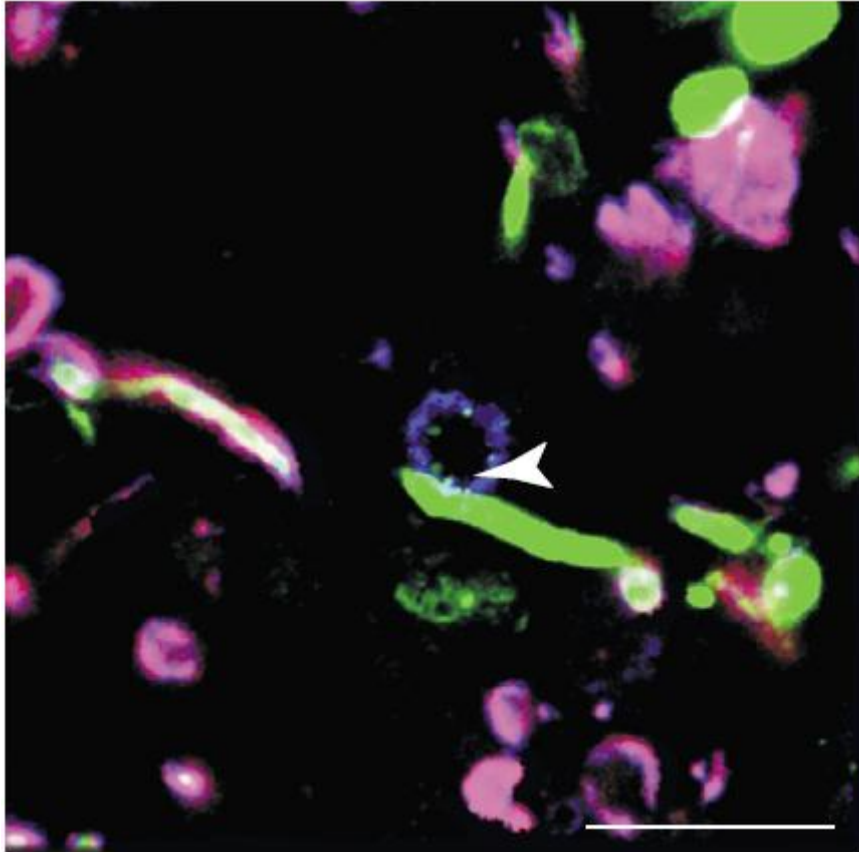


Figura 3 – Linfócito T citotóxico em contacto com um axónio desmielinizado, numa lesão aguda de EM. Os grânulos de granzima B estão polarizados, cobrindo a superfície do axónio desmielinizado. (Adaptado de Neumann, *et al.*, 2002)

3.2. LINFÓCITOS B

A activação dos linfócitos B implica a ligação entre o antigénio e o respectivo receptor à superfície destas células (BCR), que pode ser reforçada pelo co-estimulador CD40. Este é fundamental na interação com linfócitos T, da qual resulta a produção de Linfotóxina e TNF- α . Na ausência de antigénio, sob indução de CD40, os Linfócitos B produzem IL-10. (Bar-Or *et al.*, 2010)

Os Linfócitos B, e de forma semelhante os plasmócitos, tendem a reunir-se no tecido conjuntivo cerebral, isto é, nas meninges e espaços perivasculares. Os plasmócitos persistem nas fases crónicas, quando os linfócitos já não são detetados, o que pode explicar a presença de bandas oligoclonais no LCR de doentes nesta etapa. (Frischer *et al.*, 2009)

O envolvimento destas células na fisiopatologia da EM foi realçado pela eficácia de um imunomodulador, o Rituximab. Trata-se de um anticorpo monoclonal anti-CD20, isto é, dirigido contra linfócitos B, que actua induzindo nestes efeitos citotóxicos e apoptose, com diminuição do número destas células na circulação periférica, e consequentemente também no LCR, onde se observa igualmente alguma restrição no número de linfócitos T. (Cross *et al.*, 2006; Bar-Or *et al.*, 2010) Nos ensaios clínicos realizados, houve evidência clínica e imagiológica de significativa redução da actividade da doença (Hauser *et al.*, 2008; Stüve *et al.*, 2009; Harp *et al.*, 2010). O agravamento clínico ou imagiológico, em doentes previamente tratados com o Rituximab, está associado ao reaparecimento de Linfócitos B no sangue periférico, o que sugere que está a decorrer uma reactivação da actividade inflamatória da doença (Stüve *et al.*, 2009). Este fármaco parece interferir com a modulação das diferentes populações de leucócitos, mediada por citocinas (Stüve *et al.*, 2009; Bar-Or *et al.*, 2010). Induz uma redução significativa da proliferação, e subseqüentes respostas pró-inflamatórias Th1 e Th17, isto

é, da produção das respectivas citocinas pelos linfócitos T efectores CD4⁺ e CD8⁺ (Bar-Or *et al.*, 2010; Harp *et al.*, 2010). As moléculas coestimuladoras presentes condicionam a potência da actuação como apresentadoras de antígenos (Harp *et al.*, 2010). Não interfere com os níveis séricos de plasmócitos (pois não possuem CD20) ou com os níveis séricos e no LCR de anticorpos, e portanto com a síntese dos mesmos (Hauser *et al.*, 2008; Petereit *et al.*, 2008; Ireland & Monson, 2011). Desta forma, pode inferir-se que os linfócitos B podem actuar por mecanismos independentes da secreção de anticorpos na patogénese da EM, possivelmente interferindo com a activação e regulação de linfócitos T (Ireland & Monson, 2011). Existem duas vias propostas neste sentido: a primeira, assente em sinais coestimuladores através da interacção directa entre Linfócitos T e B; e a segunda, sugere a secreção de citocinas que iriam modular as respostas imunitárias celulares (Ireland & Monson, 2011). Bar-Or *et al.* (2010) demonstraram que a produção de citocinas pró-inflamatórias como a Linfotoxina e o TNF- α , pelos Linfócitos B, interfere com a activação de Linfócitos T, sendo este um dos mecanismos onde interfere o Rituximab. Foi ainda realçado, o papel do ambiente induzido pelos Th1 e da exposição a agentes infecciosos exógenos, no desenvolvimento de respostas pró-inflamatórias anómalas.

Estudos desenvolvidos para aferir o contributo destas células na fisiopatologia da EM identificaram Linfócitos B memória dirigidos a MBP e MOG, com capacidade para activar linfócitos T CD4⁺ neuro-antígenos específicos, com produção de IFN- γ em doentes com EM Recidivante-Remitente, mas não nos controlos saudáveis (Harp *et al.*, 2010). Neste estudo, em alguns dos doentes anteriormente referidos, constatou-se no sangue periférico uma densidade significativa de linfócitos B memória anti-MBP, com capacidade de induzir a proliferação de linfócitos T CD4⁺. Este dado aponta para que possa ocorrer, à periferia, activação de linfócitos B anti-MBP, com funções efectoras.

Estes poderiam activar linfócitos T em órgãos linfóides secundários periféricos, que posteriormente migrariam para o SNC, onde seriam ativados por Linfócitos B residentes. O autor reforça a importância de esclarecer estas hipóteses em novos estudos. Weber *et al.* (2010) demonstraram através de modelos animais de EAE que linfócitos B activados contra a proteína MOG são capazes de proceder à apresentação antigénica desta e induzir a diferenciação de linfócitos T MOG-específicos.

São vários os indícios da presença de resposta humoral: a síntese intratecal de imunoglobulinas, principalmente IgG (Breij *et al.*, 2008), a persistência de bandas oligoclonais IgG e a expansão clonal de Linfócitos B memória, nas lesões e no LCR. Segundo Owens *et al.* (2009), os anticorpos intratecais de plasmócitos expandidos clonalmente, em doentes com EM, não são dirigidos às proteínas major da substância branca, MOG/MBP/PLP, pelo que sugerem que se trate de um epifenómeno inespecífico. No entanto, não excluem a possibilidade de, pelo menos em alguns doentes, existirem plasmócitos anti-mielínicos, e destes interferirem na patogénese da EM (Owens *et al.*, 2009), independentemente da sua origem, já que há alteração da integridade da BHE, o que possibilita a entrada de imunoglobulinas produzidas na periferia, como relembram Mathey *et al.* (2007). Esta hipótese é reforçada pelo facto de terem sido identificados em doentes com EM anticorpos dirigidos a antígenos não-mielínicos como a proteína α - β Cristalina (Ousman *et al.*, 2007), neurofilamentos [subunidade leve (Silber *et al.*, 2002) e média (Bartos *et al.*, 2007)] e contra a neurofascina (Mathey *et al.*, 2007). A proteína α - β Cristalina tem propriedades anti-apoptóticas e neuroprotetoras, condicionando as respostas inflamatórias do sistema imunológico e do SNC. No entanto, estas funções são abolidas devido à resposta mediada pelos Linfócitos B, o que se traduz em modelos de EAE na exacerbação da inflamação e desmielinização. (Ousman *et al.*, 2007) A presença de anticorpos contra a

subunidade leve dos neurofilamentos está descrita na fase progressiva da EM, nas fases primária e secundariamente progressivas, e associa-se a lesão e perda de axónios (Silber *et al.*, 2002). IgG e IgM dirigidos contra a subunidade média dos neurofilamentos, podem ser encontrados no soro e LCR de indivíduos considerados saudáveis ou com patologias neurológicas não imune-mediadas; porém na EM, os seus valores são mais elevados, independentemente do estadió: Surto-Remissão ou Primária/Secundariamente Progressivas. Este facto pode sugerir o envolvimento precoce dos axónios como estruturas danificadas. (Bartos *et al.*, 2007) A neurofascina é uma proteína neuronal reunida nos nódulos de Ranvier dos axónios mielinizados, e constitui igualmente um possível candidato a autoantígeno na EM. Além das imunoglobulinas encontradas no soro destes doentes, verificou-se em modelos animais como a EAE, que a transferência de anticorpos anti-neurofascina é acompanhada de deposição de Complemento (fracção C9), lesão axonal, perturbação da condução nervosa e exacerbação da doença. (Mathey *et al.*, 2007)

Os anticorpos e o complemento deverão estar envolvidos no processo de fagocitose da mielina, responsável pela desmielinização, já que ambos se encontram presentes em lesões activas. (Archelos *et al.*, 2000; Breij *et al.*, 2008)

A presença de estruturas linfóides ectópicas semelhantes a folículos de linfócitos B nas meninges, preferencialmente no espaço subaracnoideu (Franciotta *et al.*, 2008), em doentes com EM Secundariamente Progressiva foi demonstrada por Magliozzi *et al.* (2007). Estes centros germinativos exibem um aparente potencial como promotores de respostas inflamatórias crónicas dirigidas contra antígenos persistentes e amplificadores das respostas autoimunes (Aloisi & Pujol-Borrell, 2006). Propiciam um microambiente dinâmico onde os linfócitos B, que são activados pelos antígenos apresentados pelas células dendríticas foliculares, proliferam e diferenciam-se, gerando plasmócitos e

linfócitos B de memória (Park & Choi, 2005). Estas estruturas, assinaladas apenas em doentes que manifestam a forma Secundariamente Progressiva, correlacionam-se com maior gravidade e rapidez de progressão da EM. Magliozzi *et al.*, 2007 descreveram maior extensão de desmielinização subpial com perda neuronal, aumento do número de lesões corticais activas, e uma activação da microglia mais acentuada. Reflectindo sobre as idades de aparecimento da doença mais precoces nestes doentes, estes autores sugeriram que um possível processo inflamatório mais agressivo pode estar na origem do microambiente permissivo, que leva à formação destes folículos. No entanto, estes autores nada concluem acerca do seu papel na patogénese, isto é, se estes são o resultado ou indutores da gravidade da mesma, quais os mecanismos que despoletam a sua formação, ou mesmo a fase em que são gerados.

3.3. IMUNIDADE INATA: CÉLULAS APRESENTADORAS DE ANTIGÉNIOS

A imunidade inata constitui a primeira linha de defesa do organismo, sendo responsável também por um papel de vigilância imunológica, para posteriormente accionar os mecanismos de imunidade adquirida. É neste sentido que as Células Apresentadoras de Antígenos (APCs) intervêm na patogénese da EM. São responsáveis pela captação, processamento e apresentação de antígenos, complementada com as moléculas co-estimuladoras que expressam; e condicionam a polarização das respostas linfocitárias T por meio da secreção de determinadas citocinas. (Chastain, *et al.*, 2010) Diferentes células apresentadoras de antígenos expressam e segregam diferentes citocinas, e conseqüentemente irão induzir diferentes respostas efectoras. Por exemplo, Monócitos ativados por LPS ou PNG (Peptidoglicano) produzem IL-1 β e IL-6 que favorecem a diferenciação Th17; por outro lado, células dendríticas derivadas de monócitos produzem maioritariamente IL-12 que inibe a polarização Th17 e simultaneamente é o principal indutor duma resposta Th1. (Acosta-Rodriguez *et al.*, 2007)

Existem vários mediadores da imunidade inata, com potencial pro-inflamatório promissor para intervir na patogénese da EM. Destaque para as Células Dendríticas, apresentadores antigénicos profissionais, para as células da microglia e células NK (*Natural Killer*) (Gandhi, *et al.*, 2010). (Figura 4)

Num modelo de EAE, Becher *et al.* (2001) demonstraram que as células da microglia proporcionam um ambiente pró-inflamatório favorável a uma activação de linfócitos T mais eficiente, pela expressão de CD40. Estas células estão adicionalmente implicadas no recrutamento de leucócitos para o interior do SNC, uma vez que são

produtores significativos de quimiocinas: CCL2, CCL3, CCL4 e CCL5. (Simpson, *et al.*, 1998)

Segundo um estudo de Van der Laan *et al.*, (1996), usando modelos animais, a fagocitose dos fragmentos de mielina e restos celulares pelos macrófagos e microglia é promotora de neuro-inflamação, uma vez que induz a libertação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α) e óxido nítrico.

Os macrófagos perivasculares constituem uma subpopulação de macrófagos residentes no SNC, localizados estrategicamente na BHE, preparados para reconhecer e apresentar antígenos a linfócitos T, expressando algumas moléculas envolvidas neste processo (MHC Classe II, CD80, CD86 e CD40), sendo expectável a sua intervenção na EM. (Fabriek, *et al.*, 2005)

As células da microglia, à semelhança dos anteriores, consistem em macrófagos residentes no SNC. No entanto distinguem-se destes por expressarem menor quantidade de CD45. Num estado quiescente, os seus níveis de MHC de Classe I ou II, CD80, CD86 e CD40 são quase indetectáveis. Porém, perante um estímulo inflamatório, estas células são capazes de produzir citocinas que induzem a diferenciação e proliferação de linfócitos T, em fenótipos Th1 (sob influencia do IFN- γ) ou Th2 (por acção da IL-4). O seu papel engloba por um lado o reconhecimento antigénico, e por outro pode funcionar como desencadeante e/ou amplificador da resposta inflamatória (Aloisi *et al.*, 1998). Gray *et al.* (2008) confirmaram em lesões corticais de doentes com EM, que estas células estão envolvidas na desmielinização cortical, através da actividade aumentada de mieloperoxidase, com produção de espécies reactivas de oxigénio, culminando na lesão neuronal.

O ambiente inflamatório característico da EM é propício à libertação de TWEAK (fraco indutor da apoptose semelhante ao TNF) pela microglia. Serafini *et al.* (2008)

evidenciaram a expressão aumentada de TWEAK, e do seu receptor Fn14 (Indutor do Factor de Crescimento de Fibroblastos 14), relacionada com perda extensa de mielina e astrócitos, lesão neuronal e alterações vasculares, em lesões corticais subpiais, com inflamação meníngea e folículos linfóides secundários concomitantes.

No entanto, as células da microglia podem desencadear reacções opostas: será o contexto inflamatório subjacente que direccionará uma resposta anti ou pro-inflamatória. Esta dualidade, segundo Weiner (2008), poderá ser benéfica na evolução da doença, evitando a progressão ou as exacerbações, se se conseguir desviar o processo neuro-destrutivo para a neuro-protecção.

As células dendríticas caracterizam-se pela capacidade de precipitar respostas celulares T CD4⁺ e CD8⁺, através da apresentação antigénica, coestimulação e secreção de citocinas que determinarão a natureza da sua diferenciação. Podem derivar de precursores mielínicos ou linfóides/plasmocitários e desenvolverem padrões funcionais distintos, quer inflamatórios quer indutores de tolerância imunológica. Os seus níveis são baixos no SNC, devido às inúmeras barreiras que evitam a sua transmigração, nos indivíduos saudáveis (Zolulya *et al.*, 2010). Apresentam, no entanto, uma localização preferencial nos compartimentos cerebrais mais vascularizados: meninges e plexos coróides (Serot *et al.*, 2000). Estudos apontam para a migração de células dendríticas, para o interior do SNC, durante os processos neuro-inflamatórios, em detrimento da hipótese que indica que estas têm origem em precursores locais. (Chastain *et al.*, 2010) Os doentes com EM apresentam DCs com fenótipo e funcionalidade alterados. Foram observadas DCs particularmente efectoras, com aumento da expressão de moléculas coestimuladoras, CD40 e CD80, no estudo de Karni *et al.* (2006), em doentes com EM Secundariamente Progressiva. O ensaio de Huang *et al.* (1999) atestou a amplificação da secreção de citocinas pro-inflamatórias como IFN- γ , TNF- α e IL-6, por estas células, em

pacientes com EM. Também a osteopontina, envolvida na quimiotaxia, activação e diferenciação de células imunológicas, é abundantemente secretada por DCs, em modelos de EAE e em pacientes com EM, polarizando os linfócitos T no fenótipo produtor de IL-17 (Murugaiyan *et al.*, 2008).

Serafini *et al.* (2006) inferiram do seu estudo, que as células dendríticas deverão contribuir para a activação e expansão local de linfócitos T patogénicos, após processos de recrutamento e maturação nas lesões de EM, onde têm acesso a auto-antígenos resultantes da destruição miélinica. Em concordância, Lande *et al.* (2008) demonstraram que ocorre mobilização e acumulação de DCs plasmocitárias nas lesões da substância branca e nas leptomeninges dos pacientes com EM, apesar de permanecer incompreendido o mecanismo que envolve estes processos.

Com recurso a modelos animais, Karman *et al.* (2004) corroboraram a hipótese de que as DCs acumuladas no SNC podem migrar para órgãos linfáticos secundários, e aí proceder à apresentação de antígenos cerebrais a linfócitos T. Desta forma, os linfócitos T activados iriam migrar e acumular-se preferencialmente no SNC. Kivisakk *et al.* (2004) propuseram que a migração das DCs seria veiculada pelo LCR.

O papel dos astrócitos nas respostas imunitárias é controverso e dúbio. Apesar de serem pouco eficazes na apresentação antigénica, alguns autores defendem a sua capacidade de produzir citocinas e quimiocinas que contribuem para o recrutamento de linfócitos T e aumento da permeabilidade da BHE, para facilitar a migração dos mesmos. São-lhe adicionalmente atribuídas propriedades neuroprotectoras e reguladoras de processos inflamatórios. (Chastain *et al.*, 2010; Farina *et al.*, 2007)

O papel das células NK na EM ou mesmo na EAE é controverso. Inúmeros estudos realizados apresentam resultados contraditórios. Porém, algumas subpopulações destes parecem manifestar um comportamento regulador na activação e sobrevivência de

4. OS ALVOS DAS RESPOSTAS LINFOCITÁRIAS: POSSÍVEIS ANTIGÉNIOS

Linfócitos T de pacientes com EM reconhecem alguns antígenos proteicos da mielina (Figura 6), nomeadamente, MBP (Proteína Básica da Mielina), PLP (Proteína proteolipídica), MOG (Glicoproteína Oligo-dendrocitária da Mielina), MOBP (Proteína Básica Oligodendrocitária associada à mielina), MAG (Glicoproteína associada à Mielina), CNPase (Fosfodiesterase dos Nucleótidos cíclicos) e OSP (Glicoproteína específica Oligodendrocitária). Há ainda a acrescentar alguns antígenos não mielínicos que podem estar igualmente envolvidos nesta doença: a proteína α - β Cristalina (Ousman *et al.*, 2007), a proteína S100 β , a Transaldolase-H (tal-H) e algumas Imunoglobulinas do LCR que atuam como auto-antígeno perpetuando a acção de linfócitos T autoreativos. (Sospedra & Martin, 2005) De referir ainda, os anticorpos encontrados em doentes com EM, anteriormente mencionados, dirigidos contra neurofilamentos, nomeadamente a subunidade leve (Silber *et al.*, 2002) e a subunidade média (Bartos *et al.*, 2007), e ainda contra a neurofascina (Mathey *et al.*, 2007).

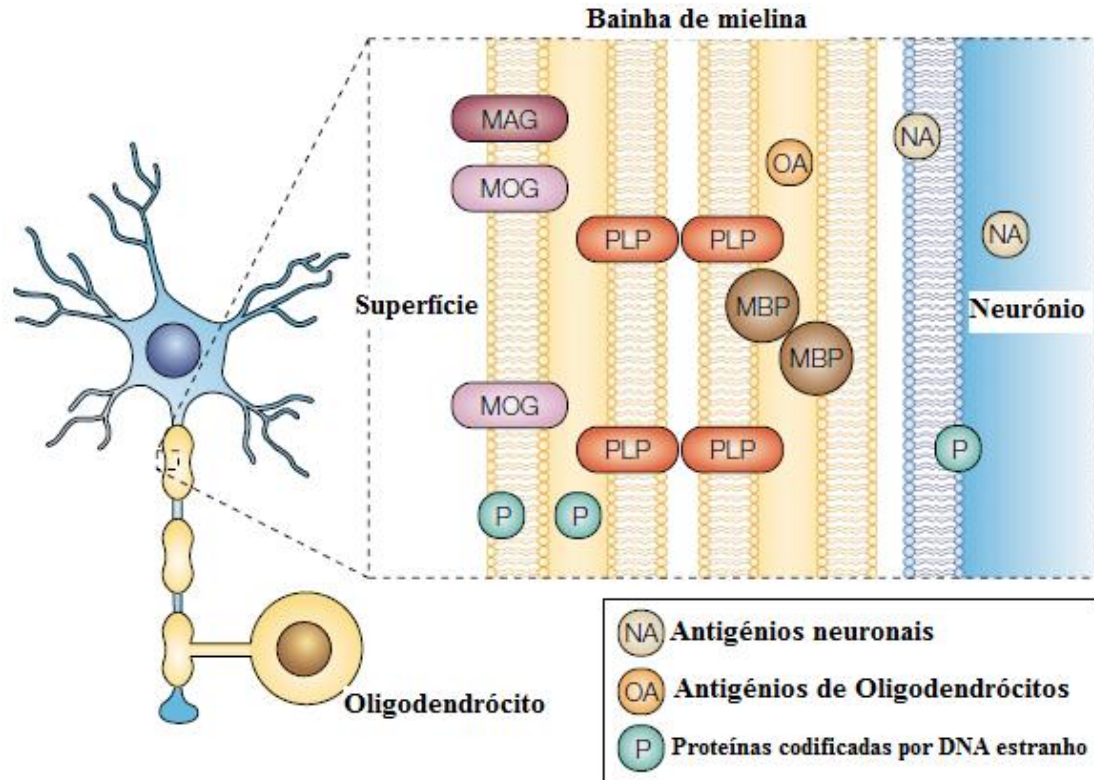


Figura 5 – Possíveis alvos antigênicos do Sistema Nervoso Central. As respostas imunes na EM podem estar direccionadas contra proteínas da bainha de mielina, oligodendrócitos e neurónios. (Adaptado de Hemmer, *et al.*, 2002)

A destruição de mielina, com libertação de epitopos, poderá favorecer a distribuição antigénica e consequente activação linfocitária, fomentando as respostas inflamatórias. (Hemmer *et al.*, 2002; Serafini *et al.*, 2006; McFarland & Martin, 2007)

O papel do vírus Epstein-Barr (EBV) na EM permanece controverso. Cepok *et al* (2005), sugeriram que proteínas do EBV poderiam representar possíveis alvos das respostas imunes na EM. No seu estudo, identificaram IgG oligoclonal no LCR específico para proteínas do EBV em doentes com EM e ainda, respostas aumentadas de linfócitos T CD8⁺ CD28⁺ contra estes antígenos. (Cepok *et al.*, 2005) Por outro lado, Sargsyan *et al.*, (2010), concluíram que o processo de desmielinização na EM deverá

ocorrer na ausência de infecção latente ou activa por EBV através de linfócitos B/plasmócitos, ao nível do SNC nestes doentes. No entanto, as proteínas detectadas neste estudo correspondem às latentes encontradas geralmente em linfócitos B circulantes de indivíduos saudáveis seropositivos para este vírus, e não houve evidência de produção intratecal significativa de anticorpos anti-EBV exclusiva da EM, contrariando a hipótese da intervenção deste agente infeccioso na sua fisiopatologia. Além disso, à semelhança do que se observa noutros estudos, não se encontra EBV nas placas. (Sargsyan *et al.*, 2010)

5. ALTERAÇÕES NA PERMEABILIDADE DA BARREIRA HEMATO-ENCEFÁLICA

As perturbações na BHE são detectadas precocemente na EM, associadas a migração transendotelial de leucócitos activados e libertação de quimiocinas e citocinas (Minagar & Alexander, 2003). A alteração da permeabilidade é evidenciada quando da utilização de gadolínio na Ressonância Magnética, que ao ser captado pelas zonas atingidas, sugere, que naqueles locais a barreira não estará íntegra, deixando-se atravessar pelo produto de contraste. (Minagar & Alexander, 2003)

A exposição do endotélio a citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , TNF- α e IL-1 β) condiciona várias alterações, a seguir descritas. (Minagar & Alexander, 2003)

A permeabilidade da barreira sofre algumas modificações na sequência de alterações estruturais nas junções intercelulares, com limitação na capacidade de impedir a entrada de solutos e células inflamatórias para o SNC. O IFN- γ e o TNF- α contribuem para a redução da síntese de proteínas como a ocludina e VE-caderina, com subsequente diminuição da integridade juncional, isto é, aumento da permeabilidade vascular e maior facilidade na migração leucocitária. (Minagar *et al.*, 2003) O factor de crescimento VEGF, profusamente detectado em lesões activas e crónicas de EM, pode intervir na alteração funcional e estrutural da BHE (Minagar & Alexander, 2003).

Por outro lado, importa referir as Metaloproteinases da Matriz (MMP), produzidas por diversas células (células endoteliais, da microglia, pericitos, macrófagos, astrócitos e linfócitos T), responsáveis por degradar a matriz extracelular e os elementos das junções intercelulares. Estão implicadas em diversos processos da patogénese da EM, em particular, na lesão focal da BHE, facilitando a infiltração linfocítica perivascular, na destruição da mielina e desmielinização em placas e ainda, na perda de axónios. (Khrestchatisky *et al.*, 2003; Minagar & Alexander, 2003)

De salientar a MMP-9, cujos níveis plasmáticos estão aumentados (em relação aos controlos), particularmente durante as exacerbações da doença e em conformidade com a presença de lesões activas na RM. (Waubant *et al.*, 1999; Minagar & Alexander, 2003; Fainardi *et al.*, 2006) Takata *et al.*, (2011) demonstraram que a MMP-9 pode ser libertada de pericitos, sob o estímulo do TNF- α .

Outros agentes podem favorecer ou induzir lesão na barreira, como os radicais de óxido nítrico, apesar de permanecer controverso o seu papel. (Boje & Lakhman, 2000)

A adesão e a migração transendotelial de leucócitos através da BHE são coordenadas por quimiocinas, citocinas e moléculas de adesão, que acabam por condicionar a composição celular do infiltrado inflamatório, na EM. As quimiocinas CCR3 e CXCR4 são amplamente expressas no endotélio cerebral, o que pode apontar para um papel destas moléculas no controlo da migração leucocitária (Berger *et al.*, 1999). Diversas quimiocinas foram detectadas em doentes com EM, nomeadamente, CCR5 e CXCR3 nos Linfócitos Th1 ou perivasculares; CCL5/RANTES e CCL3/MIP-1 α no LCR e nas lesões parenquimatosas; e CXCL10/IP-10 no LCR. (Trebst & Ransohoff, 2001; Sospedra *et al.*, 2005)

A quimiocina CXCL12 habitualmente expressa na face basolateral da célula endotelial, apresenta uma localização diferente nos doentes com EM: é encontrada na face luminal das vénulas. Este padrão de redistribuição está associado a uma maior expressão da mesma por astrócitos, e do seu ligando CXCR4, nos leucócitos do infiltrado inflamatório. Tal facto é sugestivo de um papel destas moléculas na inapropriada migração de células inflamatórias para o SNC, particularmente para as áreas que expressam esta distribuição, isto é, as de inflamação activa. (McCandless *et al.*, 2008)

Está demonstrada a perda de micropartículas endoteliais, isto é, pequenas vesículas intactas derivadas da membrana endotelial, onde podem ser identificadas moléculas de adesão, nomeadamente, PECAM-1 (CD31), CD51, endogлина (CD105), E-selectina e VCAM-1 (Minagar & Alexander, 2003). As suas respetivas formas solúveis são detectadas no plasma e LCR dos doentes com EM (Dore-Duffy *et al.*, 1993; Giovannoni *et al.* 1997; Rieckmann *et al.*, 1997; Losy *et al.*, 1999; Minagar *et al.*, 2001; Niezgodá & Losy, 2002; Kuenz *et al.*, 2005), constituindo marcadores indirectos do aumento da sua expressão no endotélio cerebral. Sugere-se que estas micropartículas representem fenómenos de stress endotelial (Minagar & Alexander, 2003); vários estudos estabelecem correlações positivas entre a detecção de níveis significativos das moléculas de adesão e indicadores de actividade da doença, como a captação de produto de contraste na RM (Dore-Duffy *et al.*, 1993; Giovannoni *et al.* 1997; Rieckmann *et al.*, 1997; Losy *et al.*, 1999; Minagar *et al.*, 2001; Niezgodá & Losy, 2002; Kuenz *et al.*, 2005). Podem ser classificadas em três grupos: das Selectinas, das Integrinas e da Superfamília de Imunoglobulinas. As selectinas intervêm no processo de adesão e rolamento dos leucócitos sobre a superfície endotelial. A interação entre as moléculas dos outros dois grupos resulta numa ligação mais firme das células inflamatórias ao endotélio, seguindo-se de diapedese. (Kuenz *et al.*, 2005) A forma não solúvel de PECAM-1 aparece com expressão aumentada em monócitos de doentes com EM (em relação aos controlos saudáveis) e nos linfócitos dos doentes com lesões activas na RM (comparando com lesões que não captam produto de contraste na RM) (Niezgodá & Losy, 2002). Estes dados apontam para a sua provável intervenção na patogénese da EM, em particular, na fase aguda.

A migração de linfócitos para o interior do SNC é mediada pela molécula de adesão VLA-4 (very-late antigen), que por sua vez se liga à VCAM-1 nas células endoteliais.

Este facto é evidenciado pela eficácia terapêutica do Natalizumab, um anticorpo monoclonal dirigido à integrina $\alpha 4\beta 1$ (componente da VLA-4), uma proteína presente na superfície dos linfócitos. Este tratamento induz uma redução dos leucócitos no LCR, nomeadamente linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$, linfócitos B $CD19^+$ e plasmócitos $CD138^+$, o que demonstra a importância deste mediador na fisiopatologia da EM. (Polman *et al.*, 2006)

A integrina $\alpha 4\beta 1$ pode ligar-se a outras moléculas, nomeadamente a osteopontina, que é expressa no endotélio inflamado, ao nível da matriz extracelular dos espaços perivasculares, e também nos astrócitos activados e células da microglia (Steinman, 2009). A osteopontina é encontrada nas lesões de EM e apresenta-se elevada no plasma destes doentes nas exacerbações. Em modelos de EAE, verificou-se que esta molécula promove a sobrevivência dos linfócitos T activados, estando implicada quer nas fases de exacerbação quer na progressão da doença, e que estimula a expressão de mediadores pró-inflamatórios, como citocinas dos fenótipos Th1 e Th17. (Hur *et al.*, 2007; Steinman, 2009) A $\alpha\beta$ -Cristalina, expressa nos astrócitos, ao contrário da anterior, tem propriedades protectoras sobre os neurónios e células gliais, ao inibir a sua apoptose, e parece ter capacidade para diminuir a produção de citocinas dos fenótipos Th1 e Th17. (Steinman, 2009) Já foram identificadas respostas autoimunes mediadas por linfócitos T e por auto-anticorpos contra esta proteína. (Hur *et al.*, 2007)

Recentemente foi proposto um mecanismo que poderá explicar como se processa a alteração da permeabilidade da BHE, como ilustrado e explicado nas figuras seguintes (Figuras 6 e 7). Assenta em duas ondas inflamatórias: a primeira resulta do influxo de linfócitos T através dos plexos coróides, que vai estimular o endotélio da BHE; a segunda, caracteriza-se por uma migração celular acentuada, com invasão e lesão do parênquima.

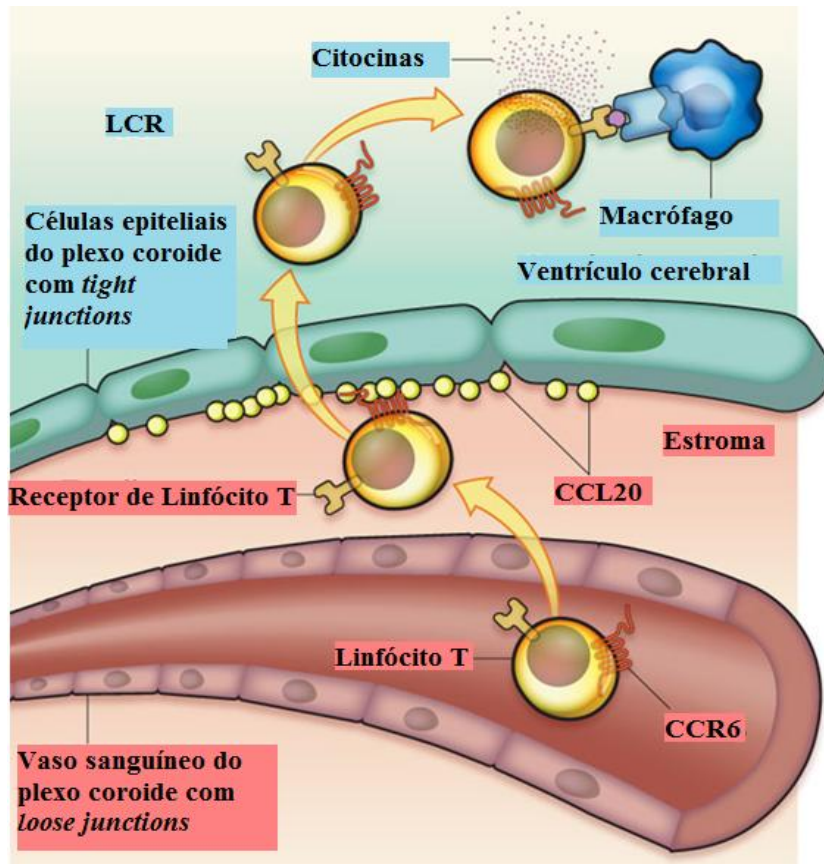


Figura 6 – Entrada inicial de linfócitos T no SNC não inflamado. Linfócitos T memória e efectores que expressam CCR6 atravessam os vasos do plexo coróide para o estroma, e daí deslocam-se pelas células epiteliais do plexo coróide, com interação das moléculas CCL20 e CCR6. Esta ligação vai permitir que os linfócitos atravessem as *junções oclusivas* das células epiteliais do plexo coróide (barreira LCR-sangue) e que entrem nos ventrículos cerebrais, de onde vão migrar para o espaço subaracnoideu. A reestimulação dos linfócitos T por macrófagos no espaço sub-aracnoideu induz a produção de factores de crescimento e inflamatórios (citocinas), expande a população de linfócitos T e estimula a BHE, permitindo a segunda onda de infiltração celular do SNC.

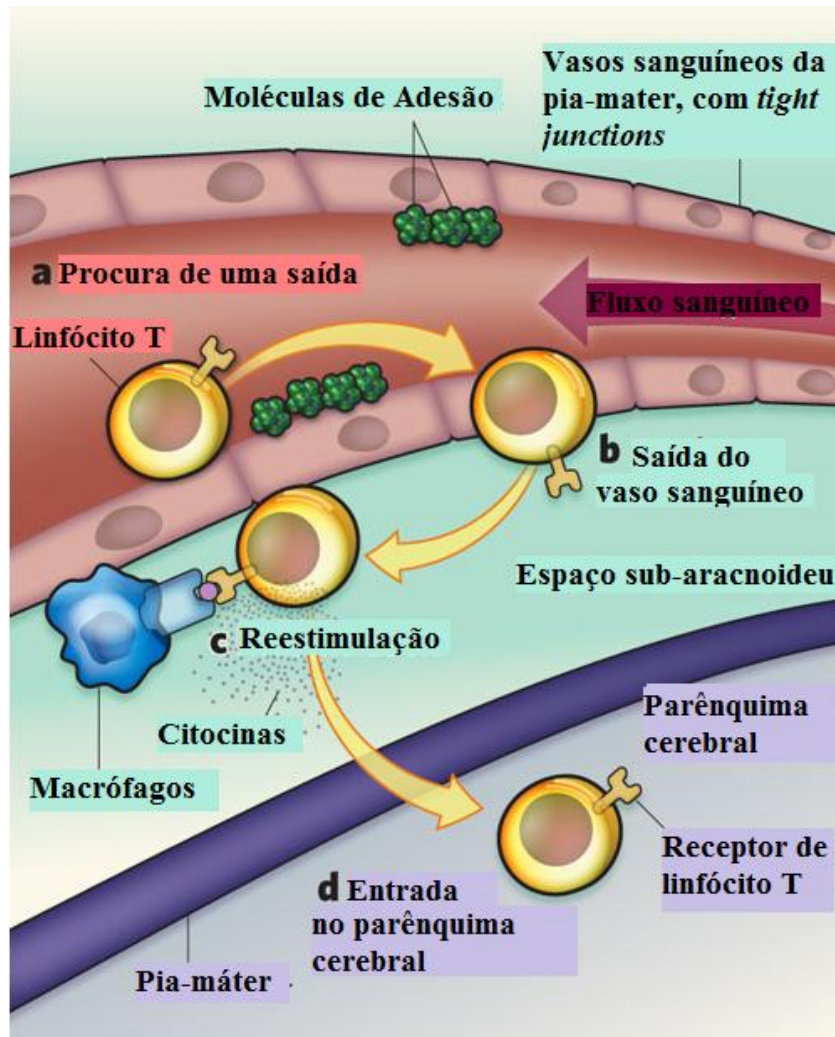


Figura 7 – Acumulação de linfócitos T no SNC, após activação da BHE. Os linfócitos T rolam ao longo e aderem à superfície interna activada dos vasos sanguíneos cerebrais, que expressam moléculas de adesão, junto à pia-mater. **a** – os linfócitos T movem-se lentamente ao longo da parede do vaso, geralmente contra a direcção do fluxo sanguíneo, em busca de uma saída. **b** – depois de atravessarem para o espaço subaracnoide, estas células deslocam-se ao longo da parede externa do vaso sanguíneo, onde contactam com macrófagos residentes locais, ocorrendo apresentação antigénica. **c** – o reconhecimento antigénico leva à reestimulação dos linfócitos T, e produção de abundante quantidade de citocinas. **d** – os linfócitos T destacam-se da superfície do vaso sanguíneo e entram no parênquima cerebral, onde induzirão lesão dos tecidos.

6. IMUNOFISIOPATOLOGIA DA ESCLEROSE MÚLTIPLA

Identificados os prováveis mediadores das alterações imunológicas que ocorrem na EM, pretende-se em seguida compreender, integrar e sumariar os mecanismos fisiopatológicos propostos e actualmente aceites.

Apesar de ainda persistirem dúvidas relativamente à questão da desregulação imunitária constituir um fenómeno primário ou secundário na patogénese da EM, o seu envolvimento é indiscutível.

6.1 FISIOPATOLOGIA DA ESCLEROSE MÚLTIPLA: HIPÓTESE

AUTO-IMUNE, INFECCIOSA E DEGENERATIVA

Hemmer, *et al.*, (2002) consideraram três possíveis mecanismos de indução da neuro-inflamação: a hipótese auto-imune, infecciosa e degenerativa. (Tabela 2)

Tabela 2 – Etiopatogénese da Esclerose Múltipla: hipótese auto-imune, infecciosa e degenerativa.

Hipótese	Prós	Contras
Auto-imune	<ul style="list-style-type: none">• Direcionada para as áreas mielinizadas do SNC;• EAE;• Associação a HLA;• Resposta a imunossuppressores e a imunomoduladores.	<ul style="list-style-type: none">• As respostas imunitárias contra antígenos mielínicos ainda não foram associadas ao início e progressão da doença.
Infecciosa	<ul style="list-style-type: none">• Associação a HLA;• Resposta ao Interferão;• Padrão de bandas oligoclonais IgG semelhantes às doenças infecciosas;• Modelos de doenças infecciosas do SNC.	<ul style="list-style-type: none">• Nenhum agente patogénico identificado até ao momento.
Degenerativa	<ul style="list-style-type: none">• Perda neuronal precoce;• Pequena inflamação na fase progressiva.	<ul style="list-style-type: none">• Associação a HLA;• Extensão e cronicidade da inflamação.

A hipótese auto-imune assenta numa etiologia primária (Figura 8). É sustentada por um modelo animal que mimetiza as alterações encontradas na EM: a EAE. Este enfatiza o papel auto-imune de respostas mediadas por linfócitos Th1 a antígenos mielínicos. Porém, até ao momento ainda não foram identificados os auto-antígenos em causa, pelo que já foi proposto um mecanismo de reacções cruzadas contra antígenos estranhos (não

“self”) associado a mimetização molecular e diversificação de epitopos. Neste sentido, a lesão inicial causada pelos linfócitos T auto-reactivos induziria reacções inflamatórias contra epitopos miélnicos adicionais libertados, perpetuando a doença. Os factores de risco genéticos relacionados com o HLA e a eficácia de tratamentos imunossupressores e imunomoduladores também corroboram esta hipótese.

Considerando processos etiológicos secundários, tendo por base outras situações que cursam com inflamação, foram propostos dois mecanismos: um infeccioso e outro degenerativo (Figura 8).

A teoria infecciosa baseia-se na premissa de que uma inadequada resposta imunitária poderá contribuir para a progressão da doença. É fundamentada por estudos de infecções virais em modelos animais (Vírus da encefalomielite murina de Theiler e o Vírus da hepatite murina). Uma infecção do SNC pode envolver a produção de IgG oligoclonais e respostas clonais de linfócitos B, à semelhança do que é observado na EM. Ao contrário da anterior, a resposta imune é secundária à actividade inflamatória dirigida ao agente infeccioso. Apesar da incessante procura de um microrganismo responsável, até agora não há evidências conclusivas nesse sentido.

Finalmente, a proposta de uma etiologia neurodegenerativa, é suportada por dados inferidos de patologias deste foro, que mostram que a perda da integridade dos tecidos neuronais está associada à activação da microglia, produção de citocinas, gliose e infiltração leucocitária. O tecido cerebral danificado permite a libertação de antígenos para a periferia que podem promover o desenvolvimento de respostas imunes antígeno-específicas. A evidência de que ocorre precocemente na EM perda de neurónios e oligodendrócitos reforça esta corrente.

Expostas as três hipóteses, importa referir que a que reúne mais consenso é a auto-imune, sendo o modelo EAE o mais usado para estudar a EM.

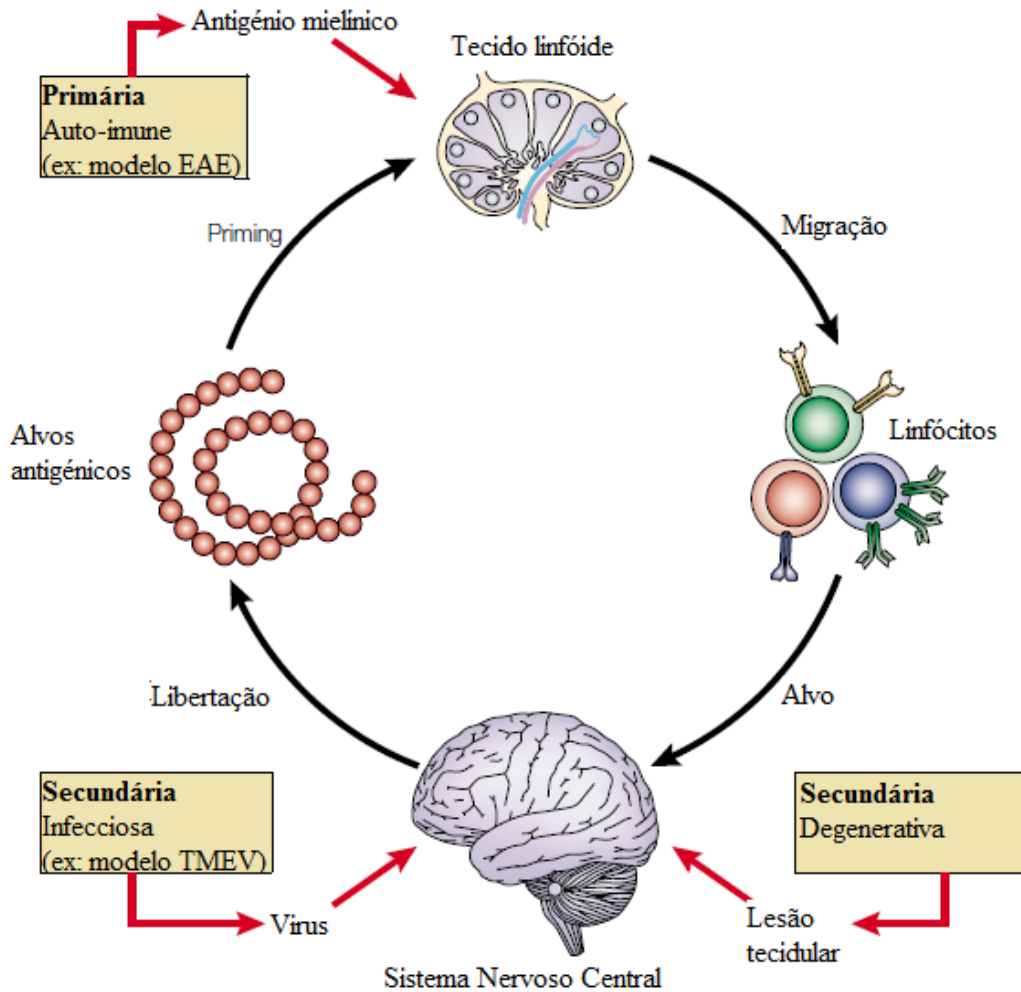


Figura 8 – Possíveis mecanismos que conduzem à neuroinflamação. Os antígenos neuronais são libertados e conduzidos aos nódulos linfáticos, onde são apresentados a linfócitos B e T, por APCs (como as Células Dendríticas). Linfócitos B e T com receptores de alta afinidade para estes antígenos, expandem-se e são libertados dos nódulos linfáticos. Estas células deslocam-se no organismo e vão-se acumular nos locais onde reencontram o antígeno que lhes induziu o “priming”. Na reactivação adoptam funções efectoras. No modelo de auto-imunidade, a imunização periférica com antígenos do tecido cerebral pode induzir uma resposta auto-imune direccionada contra estes, gerando inflamação primária no SNC. A introdução de antígenos estranhos (não “self”), por exemplo virais, ou uma lesão cerebral aguda, como um acidente vascular cerebral, desencadeia a libertação de antígenos para a periferia, despertando uma resposta imune secundária.

6.2 RESPOSTAS IMUNOLÓGICAS NA ESCLEROSE MÚLTIPLA

Independentemente da etiologia, há duas condições indispensáveis para ser induzida uma resposta imune: por um lado, um ambiente pró-inflamatório no SNC com maior expressão de moléculas de MHC, receptores de co-estimulação e citocinas inflamatórias; e por outro lado, uma resposta imune mediada por antigénios. (Hemmer, *et al.*, 2002)

O processo que se julga implicado na patogénese da EM (Figura 9), com base nos dados anteriormente explanados, parece ter início na activação periférica de linfócitos T e B, que reconhecem antigénios do SNC. Estes antigénios podem ter origem no processo de mimetização molecular, com reacções cruzadas (hipótese auto-imune) ou em microrganismos com tropismo para o SNC. São apresentados em tecido linfóide secundário por células dendríticas, com o auxílio de moléculas de MHC de classe I e II, dirigindo-se respectivamente a linfócitos T CD8⁺ e CD4⁺, ou por meio de proteínas solúveis captadas pelos linfócitos B. Estas células que foram activadas pela APC, vão desenvolver expansão clonal e adquirir funções efectoras. Facilitada pelo gradiente quimiotáctico gerado, estes leucócitos irão migrar para o SNC, atravessando a BHE (adesão, atracção e invasão) cuja permeabilidade está alterada, em busca do seu alvo, onde vão ser reativados. Os Linfócitos B e T reativados vão sofrer distintos processos de diferenciação e induzir respostas funcionais concordantes com esta, nomeadamente na produção de anticorpos e citocinas, na capacidade citotóxica, ou na mobilização de outras células inflamatórias, como os macrófagos. Finda a agressão mediada pelos sistemas inato e adquirido, os seus participantes seguirão um de dois rumos possíveis: indução da própria morte celular ou redistribuição para outros locais/tecidos. Paralelamente, decorre o processo de remielinização por intervenção de progenitores de oligodendrócitos e factores de crescimento. Como já foi referido, a EM é caracterizada por significativa heterogeneidade, determinada em parte por factores genéticos, pelo que

é expectável que este protótipo sofra alguns reajustes ao longo da evolução da doença ou mesmo em doentes com padrões distintos desta patologia. (Hemmer *et al.*, 2002)

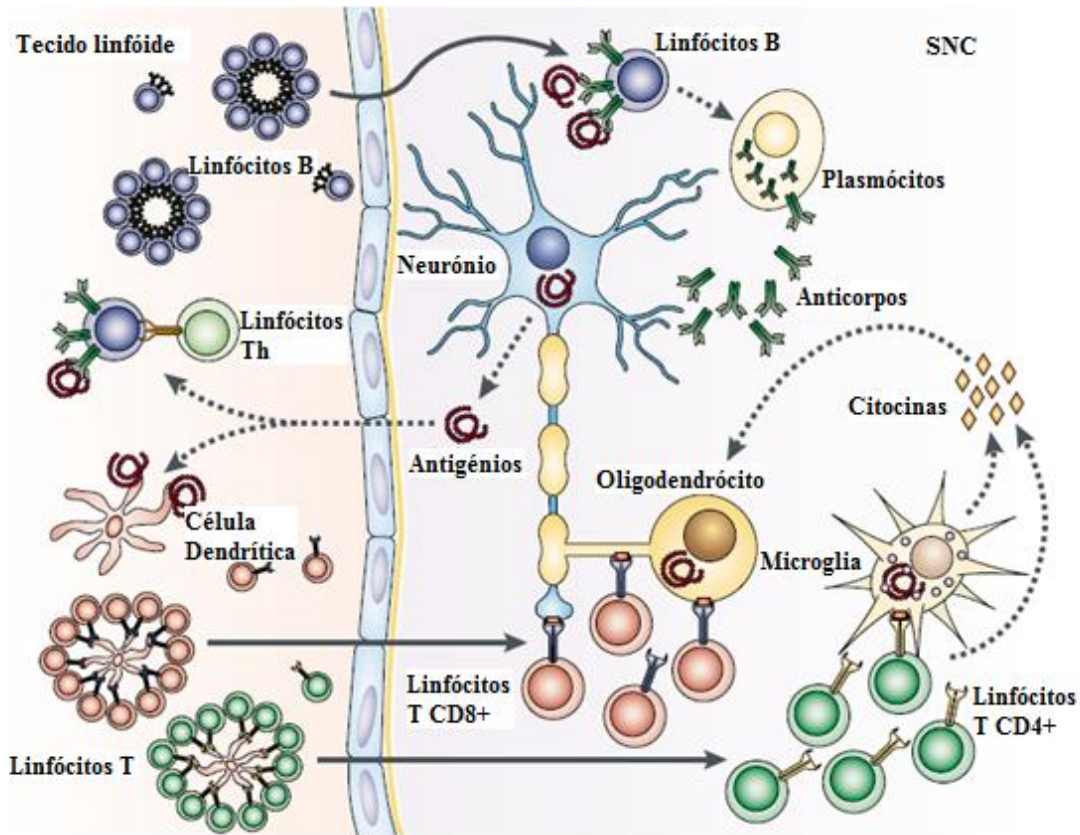


Figura 9 - Modelo hipotético das respostas imunes na fase aguda da EM. As respostas mediadas pelos linfócitos T e B são induzidas no tecido linfóide periférico, por antígenos libertados do SNC ou reacções cruzadas com antígenos estranhos. A apresentação antigénica é conduzida pelas células dendríticas, cujo estímulo é particularmente marcado nos linfócitos T. Ocorre expansão clonal das células activadas (B e T), que são mobilizadas para o SNC. Os linfócitos B, ao encontrarem o respectivo antígeno, diferenciam-se em plasmócitos, com libertação de anticorpos, IgG, que se vão ligar ao seu alvo (na forma solúvel ou acoplado à membrana). Os linfócitos T CD8⁺ também migram para o SNC, dirigindo-se ao ligando peptídico específico, nas células da glia ou neuronais, acoplado a moléculas de MHC de classe I; a interação de ambas as células culmina na lesão das segundas. Os linfócitos T CD4⁺ dirigem-se aos respectivos antígenos, apresentados por células da microglia, em moléculas de MHC de classe II. A reactivação destas células propicia a produção de citocinas pró-inflamatórias, com funções de quimiotaxia, na mobilização de macrófagos, que por sua vez libertam mediadores imunes tóxicos e fagocitam a bainha de mielina. (Adaptado de Hemmer *et al.*, 2002)

A imunidade inata e adaptativa está envolvida no processo fisiopatológico, observando-se uma propensão para prevalecerem em fases distintas. Numa etapa mais

precoce, relacionada com as manifestações de surto-remissão, parece haver uma acentuada influência do sistema imunitário adaptativo, mediada pela actividade dos linfócitos T e B, direccionados contra auto-antígenos do SNC. Clinicamente, os períodos de maior actividade destas células são traduzidos pelas exacerbações. Posteriormente, na fase progressiva, a inflamação crónica ligada à activação no sangue periférico de células dendríticas, perpetua a activação da microglia no SNC. Daqui resulta um processo inflamatório difuso, com lesão dos axónios, clinicamente demonstrado pela acumulação de incapacidade neuronal. (Weiner, 2008)

Pender & Greer (2007) destacam na fase de Surto-Remissão, um processo de desmielinização com preservação dos axónios ou transecção destes, associado a um infiltrado inflamatório composto por linfócitos B e T, macrófagos e microglia activada. Nas fases progressivas (primária ou secundária), haveria desmielinização do córtex cerebral com actividade inflamatória menos activa, com infiltração de mononucleares nas meninges contíguas e lesões axonais difusas, de localização preferencial nas camadas subpiaais. (Figura 10)

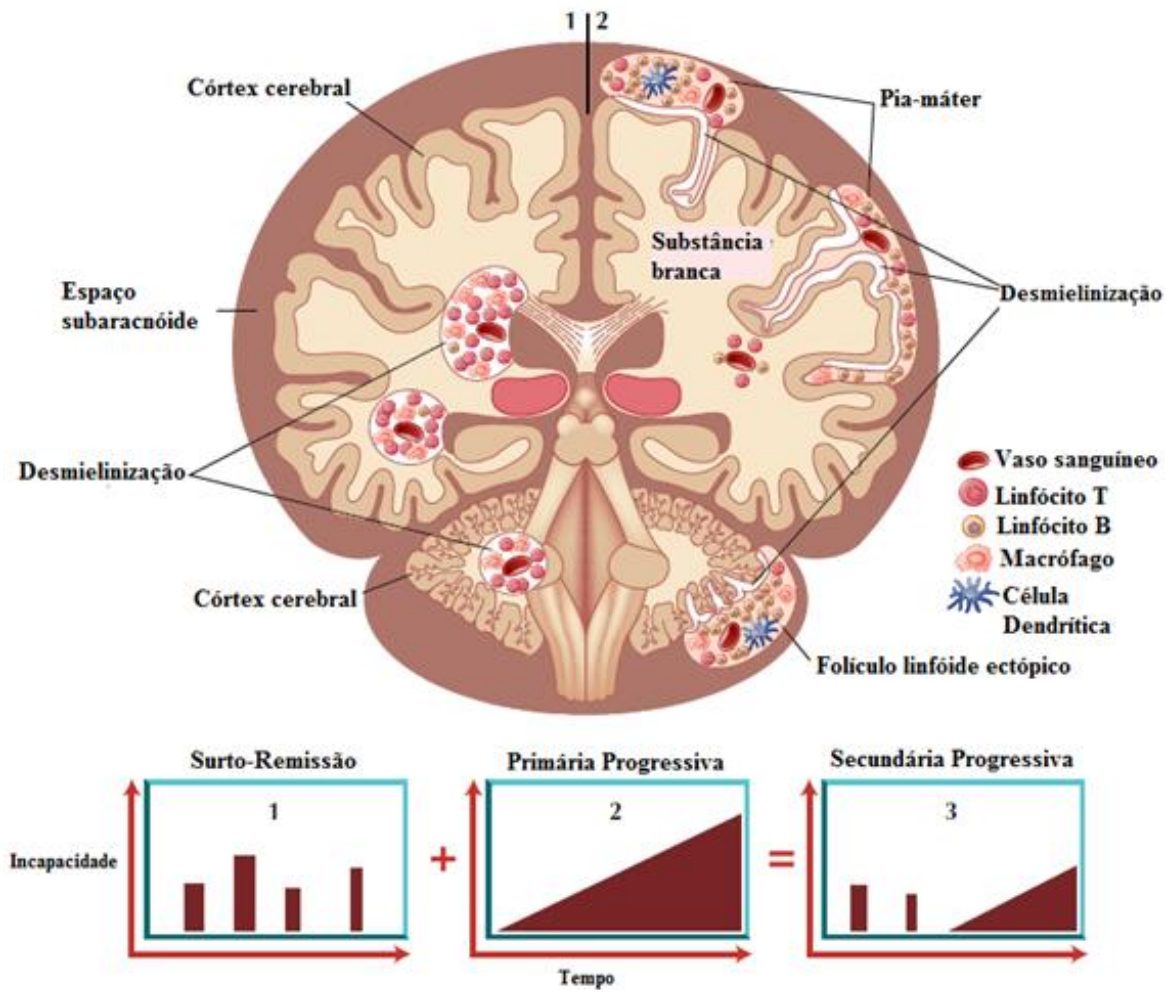


Figura 10- Substratos imunopatogénicos propostos para as diferentes formas de evolução da EM. Na secção coronal do SNC estão representados os substratos imunopatogénicos expectáveis para as fases de Surto-Remissão (1) e Primária Progressiva (2); e nos gráficos, a clínica, em termos de incapacidade ao longo do tempo nas diversas fases. Na fase de Surto-Remissão, as lesões na substância branca deverão ser mediadas por linfócitos T auto-reactivos, que migraram do sangue periférico. Na Primária Progressiva (ou na etapa progressiva da fase Secundária Progressiva) prevalece o papel de auto-anticorpos, produzidos por linfócitos B nos folículos linfóides ectópicos nas meninges, induzindo desmielinização no córtex cerebral ou cerebelar adjacente. Estas estruturas semelhantes a folículos linfóides ectópicos só foram ainda identificadas nas formas Secundárias Progressivas. (Adaptado de Pender & Greer, 2007)

7. IMUNOFISIOPATOLOGIA DA ESCLEROSE MÚLTIPLA: IMPLICAÇÕES TERAPÊUTICAS

O conhecimento dos mecanismos celulares e bioquímicos envolvidos na patogénese da EM permitem desenvolver tratamentos mais eficazes e seguros. No entanto, esta entidade patológica é marcada por significativa heterogeneidade. O amplo espectro da EM na apresentação clínica, histopatológica, serológica e na sua evolução ao longo do tempo, repercute-se necessariamente nas respostas aos tratamentos modificadores da doença. Desta forma, faria sentido personalizar os esquemas terapêuticos, de acordo com as características do processo patológico subjacente.

Ao longo deste trabalho, foram identificadas diversas células e moléculas possivelmente envolvidas na etiopatogénese. O reconhecimento das mesmas e da forma como interagem entre si ao longo de todo o processo, oferece a oportunidade de seleccionar alvos terapêuticos e delinear as respectivas estratégias, para uma abordagem mais dirigida, que modifique a evolução da doença. No tratamento, como ilustra a Figura 11, importa por um lado, considerar os diversos componentes do sistema imunitário, a forma como actuam e o seu impacto na doença; por outro lado, é importante prevenir a degeneração dos axónios, e ainda, estimular a remielinização e reparação dos tecidos danificados.

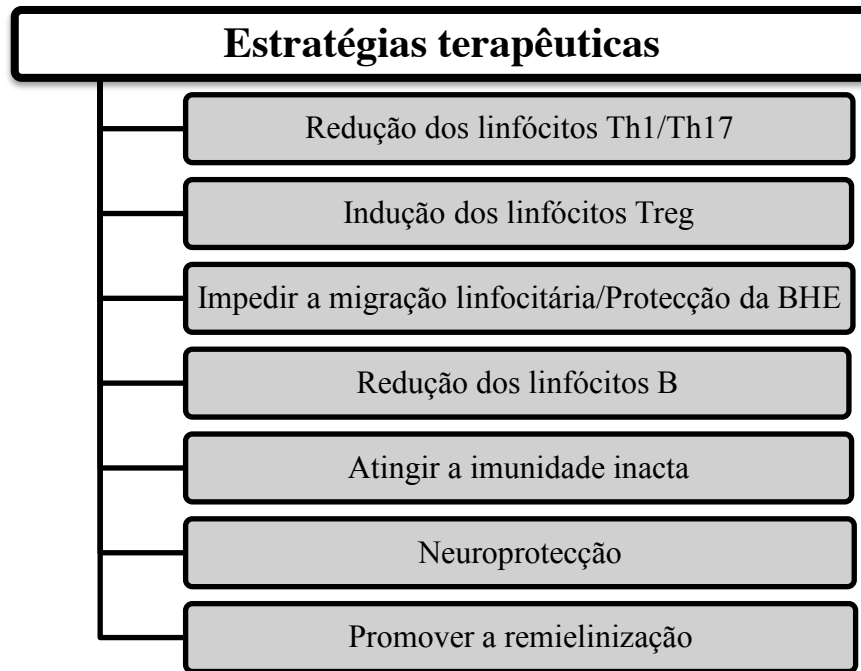


Figura 11 – Possíveis alvos terapêuticos no tratamento da Esclerose Múltipla.

A investigação científica tem sido incessante na busca de tratamentos que demonstrem eficácia e segurança. Muitos dos potenciais fármacos desenvolvidos e testados em modelos experimentais, como a EAE, falharam nos testes clínicos, por falta de segurança e/ou de eficácia. Este facto levou a que o paradigma da EM como uma doença auto-imune mediada por Linfócitos T CD4⁺ fosse ultrapassado, alargando a pesquisa a outros domínios do sistema imunitário e ainda da neurodegeneração.

As estratégias terapêuticas actualmente disponíveis estão fundamentalmente direccionadas para o processo inflamatório, distinguindo-se os imunomoduladores e os imunossuppressores, como agentes modificadores da doença. (Tabela 3)

Tabela 3 – Agentes terapêuticos imunomoduladores/imunossupressores que demonstraram eficácia no tratamento de EM, e respectivo mecanismo de acção.

(DeAngelis & Lublin, 2008)

Agente terapêutico	Acção
Interferão- β	<ul style="list-style-type: none">• Contrariar os efeitos do IFN-γ (previne as alterações na BHE)• \downarrow expressão de moléculas de MHC classe II• \downarrownível de expressão de MMPs
Acetato de Glatirâmero	<ul style="list-style-type: none">• Indução de citocinas supressoras e diminuição da actividade inflamatória, via Th2
Rituximab	<ul style="list-style-type: none">• Anti-CD20 – depleção de linfócitos B
Natalizumab	<ul style="list-style-type: none">• Anti-integrina α-4 (molécula de adesão à superfície dos leucócitos) – interfere com a entrada de linfócitos T no SNC
Fingolimod	<ul style="list-style-type: none">• Sequestro de linfócitos nos órgãos linfáticos secundários (impede a sua entrada no SNC)• \downarrow linfócitos Th17
Alemtuzumab	<ul style="list-style-type: none">• Anti-CD52 – depleção de linfócitos T, células NK
Daclizumab	<ul style="list-style-type: none">• Anti-CD25 – diminuição da estimulação da acção dos linfócitos T pela IL-2
Ácido Fumarínico	<ul style="list-style-type: none">• Inibição de moléculas de adesão e citocinas pró-inflamatórias• Efeitos neuroprotectores
Cladribina	<ul style="list-style-type: none">• Depleção de subpopulações de linfócitos
Estatinas	<ul style="list-style-type: none">• Redução do IFN-γ• Supressão da secreção de citocinas Th1• Inibição da adesão dos linfócitos T, prevenindo que alcancem as áreas de inflamação

Em Portugal, os fármacos prescritos a doentes com EM incluem, no grupo dos imunomoduladores, o Interferão β 1a e 1b, o Acetato de Glatirâmero, o Fingolimod e o Natalizumab; a Mitoxantrona é o único imunossupressor recomendado. No entanto, em alguns doentes são prescritos outros imunossupressores *of-label*, como a Azatioprina, a Ciclofosfamida, o Metotrexato e o Micofenolato de mofetil. (Tabela 4)

Tabela 4 – Agentes terapêuticos da EM, de uso corrente em Portugal.

Imunomoduladores	Imunossupressores	Outros imunossupressores (<i>of-label</i>)
<ul style="list-style-type: none">• Interferão β (1a e 1b)• Acetato de glatirâmero• Natalizumab• Fingolimod	<ul style="list-style-type: none">• Mitoxantrona (aprovado FDA)	<ul style="list-style-type: none">• Azatioprina• Ciclofosfamida• Metotrexato• Micofenolato de mofetil

CONCLUSÃO

A imunologia da EM é extremamente complexa e a sua compreensão tem sido dificultada pela contradição nos resultados de muitíssimos e diferentes estudos desenvolvidos. Os estudos em animais, apesar de apostarem em modelos que mimetizam as alterações da condição patológica em análise, são incapazes de reproduzir a complexidade do sistema imunitário humano, ou as condicionantes inerentes ao paciente, e que condicionam a evolução da doença. No entanto, constituem a forma mais dinâmica de estimular e induzir determinados padrões de actividade, para aferir acerca do seu potencial papel na EM, impossíveis de realizar em humanos.

A apresentação desta patologia é variável, observando-se ainda assim, na maioria dos doentes, um padrão inicial de exacerbação-remissão que mais tarde evolui de forma secundariamente progressiva, sem recuperação entre os surtos. Porém em cerca de 10% dos casos, a evolução é desde logo, primariamente progressiva, com deterioração gradual e crescente.

O papel da Inflamação e da Neurodegenerescência na EM é dúbio, não estando estabelecidas relações temporais ou causais para ambos. Este trabalho focou-se essencialmente no componente inflamatório, como fenómeno primário ou secundário. A inflamação intervém irrefutavelmente na fisiopatologia da EM, como se pode inferir da presença dos mediadores imunes nas lesões e dos resultados bastante favoráveis obtidos pela manipulação de imunomediadores (com imunomoduladores). O mecanismo precipitante e alterações precoces subjacentes permanecem ainda desconhecidos e controversos, estando propostas etiologias primárias, com intervenção da auto-imunidade, bem como secundárias, que envolvem agentes infecciosos ou neurodegenerescência.

A EM manifesta-se por desregulação imunitária, com desequilíbrio na homeostase entre as respostas anti e pro-inflamatórias, ao longo da evolução da doença, quer nas fases agudas/exacerbações, quer na fase crónica/progressiva, com modificação do substrato inflamatório. Está envolvida na formação das lesões, e ainda na perpetuação da actividade inflamatória e detioração. Inicialmente, o protagonismo foi atribuído aos linfócitos T CD4⁺. No entanto, a ineficácia das terapêuticas dirigidas contra estes agentes levou a que fossem alargados os horizontes de investigação, culminando na descoberta de outras células e moléculas envolvidas na etiopatogénese da EM: linfócitos T CD4⁺ auxiliares produtores de IL-17, linfócitos T CD8⁺, linfócitos B, e linfócitos T reguladores (CD4⁺ e CD8⁺). Os linfócitos T CD4⁺ parecem estar mais relacionados com o despoletar da resposta inflamatória patológica, ao passo que os linfócitos T CD8⁺ e B actuam particularmente na perpetuação da doença.

Porém, o encadeamento do processo fisiopatológico não é igualmente sequencial em todos os doentes. Assiste-se a uma marcada heterogeneidade na composição do infiltrado inflamatório nas placas desmielinizadas, que conduziu à classificação em quatro padrões histopatológicos (Classificação de Lucchinetti *et al*, 2000).

Ainda assim, sugere-se que a activação de todo este processo ocorra a nível periférico, nos gânglios linfáticos, onde os antígenos neuronais (mielínicos e/ou não mielínicos) serão apresentados por APCs a linfócitos T e B. Após a sua expansão, estas células são mobilizadas para o SNC, através de uma BHE demasiado permissiva. A disrupção da BHE é mediada pela acção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e o IFN- γ , que modificam os mecanismos de coesão/integridade da barreira, através de alterações estruturais – interferência com a produção/expressão de proteínas estruturais e degradação dos elementos de coesão pelas MMPs. Adicionalmente, desenvolve-se um gradiente quimiotáxico, por meio de quimiocinas, citocinas e expressão selectiva de

moléculas de adesão, que incitam a migração transendotelial de leucócitos para o SNC e que, desta forma, vão seleccionar a composição do infiltrado inflamatório.

O processo patológico torna-se então confinado a regiões localizadas do SNC, onde operam a imunidade inata, celular e humoral.

A imunidade inata é um componente importante, com particular relevo para as células dendríticas, macrófagos e células da microglia. É responsável pela apresentação antigénica e geração de microambiente pro-inflamatório que permite a activação e diferenciação de linfócitos T e B. Os macrófagos estão incumbidos de fagocitar os restos mielínicos e celulares resultantes da acção da imunidade celular e humoral. A destruição da mielina favorece a libertação e redistribuição de epitópos, com consequente expansão e perpetuação da actividade inflamatória.

Os fenótipos pró-inflamatórios dos linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ vão desencadear a cascata de mecanismos imunes, que abrangem desde a quimiotaxia, à mobilização de macrófagos ou mesmo acção citotóxica directa. Os linfócitos Th17 em particular, relacionam-se com formas mais severas de EM.

Assiste-se ainda, a uma desregulação dos mecanismos supressores da inflamação, nomeadamente pela redução e disfunção de linfócitos Treg, pelo aumento de moléculas que promovem a sobrevivência de linfócitos T efectores, e pela restrição de moléculas com propriedades neuro-protectoras (que inibem a apoptose neuronal e glial).

Da imunidade humoral há a destacar a interacção entre os linfócitos B e T, por meio da qual ocorre a apresentação antigénica, com posterior activação de linfócitos T. O papel dos anticorpos não é consensual, apesar da presença de bandas oligoclonais. Na forma secundariamente progressiva, encontram-se por vezes estruturas linfóides ectópicas, potencialmente promotoras de um processo inflamatório crónico, associadas a maior severidade e rapidez de progressão da doença.

A importância do conhecimento da fisiopatologia da EM reside no seu potencial para sugerir novos biomarcadores, que permitam identificar o padrão inflamatório, para assim, individualizar as terapêuticas. Desta forma poder-se-á intervir no processo patológico, para impedir a sua formação e progressão, prevenindo a deterioração neurológica.

BIBLIOGRAFIA

Acosta-Rodriguez E, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F (2007) Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol.*, 8(9):942-9.

Aloisi F, Pujol-Borrell R (2006) Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol.*, 6(3):205-17.

Aloisi F, Ria F, Penna G., Andorini L (1998) Microglia are more efficient than astrocytes in antigen processing and in Th1 but not Th2 cell activation. *J. Immunol.*, 160, 4671-4680.

Archelos J, Storch M, Hartung H (2000) The role of B cells and autoantibodies in multiple sclerosis. *Ann Neurol.*, 47(6):694-706.

Bar-Or A (2008) The Immunology of Multiple Sclerosis. *Semin Neurol.*, 28(1):29-45.

Bar-Or A, Fawaz L, Fan B, Darlington P, Rieger A, Ghorayeb C, et al. (2010). Abnormal B-cell cytokine responses a trigger of T-cell-mediated disease in MS? *Ann Neurol* , 67(4):452-61.

Bartos A, Fialová L, Soukupová J, Kukul J, Malbohan I, Pit'ha J (2007) Elevated intrathecal antibodies against the medium neurofilament subunit in multiple sclerosis. *J Neurol.*, 254(1):20-5.

Becher B, Durell B, Miga A, Hickey W, Noelle R (2001) The clinical course of experimental autoimmune encephalomyelitis and inflammation is controlled by the expression of CD40 within the central nervous system. *J Exp Med.*, 193(8):967-74.

Berger O, Gan X, Gujuluva C, Burns A, Sulur G, Stins M, Way D, Witte M, Weinand M, Said J, Kim KS, Taub D, Graves MC, Fiala M (1999) CXC and CC chemokine receptors on coronary and brain endothelia. *Mol Med.*, 5(12):795-805.

Boje K, Lakhman S (2000) Nitric oxide redox species exert differential permeability effects on the blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther.*, 293(2):545-50.

Breij E, Brink B, Veerhuis R, van den Berg C, Vloet R, Yan R, Dijkstra CD, van der Valk P, Bö L (2008). Homogeneity of active demyelinating lesions in established multiple sclerosis. *Ann Neurol.*, 63(1):16-25.

Cepok S, Zhou D, Srivastava R, Nessler S, Stei S, Büssow K, Sommer N, Hemmer B (2005) Identification of Epstein-Barr virus proteins as putative targets of the immune response in multiple sclerosis. *J Clin Invest.*, 115(5):1352-60.

Chastain EM, Duncan DS, Rodgers JM, Miller, SD (2010) The role of antigen presenting cells in multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta*, 1812(2):265-74.

Correale J, Gilmore W, McMillan M, Li S, McCarthy K, Le T, Weiner LP (1995). Patterns of cytokine secretion by autoreactive proteolipid protein-specific T cell clones during the course of multiple sclerosis. *J Immunol.*, 154(6):2959-68.

Cross A, Stark J, Lauber J, Ramsbottom M, Lyons J (2006) Rituximab reduces B cells and T cells in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol.*, 180(1-2):63-70.

DeAngelis T, Lublin F (2008) Multiple sclerosis: new treatment trials and emerging therapeutic targets. *Curr Opin Neurol.*, 21(3):261-71.

Fabrick BO, Van Haastert ES, Galea I, Polfliet MM, Dopp ED, Van Den Heuvel MM, Van Den Berg TK, De Groot CJ, Van Der Valk P, Dijkstra CD (2005) CD163- positive perivascular macrophages in the human CNS express molecules for antigen recognition and presentation. *Glia*, 51(4):297-305.

Fainardi E, Castellazzi M, Bellini T, Manfrinato M, Baldi E, Casetta I, Paolino E, Granieri E, Dalocchio F (2006). Cerebrospinal fluid and serum levels and intrathecal production of active

matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) as markers of disease activity in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler.*, 12(3):294-301.

Farina C, Aloisi F, Meinl E (2007) Astrocytes are active players in cerebral innate. *Trends Immunol.*, 28(3):138-45.

Franciotta D, Salvetti M, Lolli F, Serafini B, Aloisi F (2008) B cells and multiple sclerosis. *Lancet Neurol.*, 7(9):852-8.

Frischer J, Bramow S, Dal-Bianco A, Lucchinetti C, Rauschka H, Schmidbauer M, Laursen H, Sorensen PS, Lassmann H (2009) The relation between inflammation and. *Brain*, 132(Pt 5):1175-89.

Gandhi R, Laroni A, Weiner H (2010) Role of the innate immune system in the pathogenesis of multiple. *J Neuroimmunol.*, 221(1-2):7-14.

Giovannoni G, Lai M, Thorpe J, Kidd D, Chamoun V, Thompson AJ, Miller DH, Feldmann M, Thompson EJ (1997) Longitudinal study of soluble adhesion molecules in multiple sclerosis: correlation with gadolinium enhanced magnetic resonance imaging. *Neurology.*, 48(6):1557-65.

Gray E, Thomas T, Betmouni S, Scolding N, Love S (2008) Elevated activity and microglial expression of myeloperoxidase in demyelinated cerebral cortex in multiple sclerosis. *Brain Pathol.*, 18(1):86-95.

Harp C, Ireland S, Davis L, Remington G, Cassidy B, Cravens PD, Stuve O, Lovett-Racke AE, Eagar TN, Greenberg BM, Racke MK, Cowell LG, Karandikar NJ, Frohman EM, Monson NL (2010) Memory B cells from a subset of treatment-naïve relapsing-remitting multiple sclerosis patients elicit CD4(+) T-cell proliferation and IFN- γ production in response to myelin basic protein and myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Eur J Immunol.*, 40(10):2942-56.

Hauser S, Waubant E, Arnold D, Vollmer T, Antel J, Fox RJ, Bar-Or A, Panzara M, Sarkar N, Agarwal S, Langer-Gould A, Smith CH (2008) B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med.*, 358(7):676-88.

Hemmer B, Archelos JJ, Hartung HP (2002) New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurosci*, 3:291–301.

Huang Y, Xiao B, Ozenci V, Kouwenhoven M, Teleshova N, Fredrikson S, Link H (1999) Multiple sclerosis is associated with high levels of circulating dendritic cells secreting pro-inflammatory cytokines. *J Neuroimmunol*, 99(1):82-90.

Hur E, Youssef S, Haws M, Zhang S, Sobel R, Steinman L (2007) Osteopontin-induced relapse and progression of autoimmune brain disease through enhanced survival of activated T cells. *Nat Immunol* , 8(1):74-83.

Ireland S, Monson N (2011) Potential impact of B cells on T cell function in multiple sclerosis. *Mult Scler Int*, 2011:423971.

Jacobsen M, Cepok S, Quak E, Happel M, Garber R, Ziegler A, Schock S, Oertel WH, Sommer N, Hemmer B (2002) Oligoclonal expansion of memory CD8+ T cells in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Brain* , 125(Pt 3):538-50.

Karman J, Ling C, Sandor M, Fabry Z (2004) Initiation of immune responses in brain is promoted by local dendritic cells. *J Immunol*, 173(4):2353-61.

Karni E, Abraham M, Monsonego A, Cai G, Freeman G, Hafler D, Khoury SJ, Weiner HL (2006) Innate immunity in multiple sclerosis: myeloid dendritic cells in secondary progressive multiple sclerosis are activated and drive a proinflammatory immune response. *J Immunol*, 177(6):4196-202.

Kasper L, Shoemaker J (2010) Multiple sclerosis immunology: The healthy immune system vs the MS immune system. *Neurology*, 74 Suppl 1:S2-8.

Khrestchatisky M, Jourquin J, Ogier C, Charton G, Bernard A, Tremblay E, (2003) Matrix metalloproteinases and their inhibitors, modulators of neuro-immune interactions and of pathophysiological processes in the nervous system. *J Soc Biol*, 197(2):133-44.

Kivisakk P, Mahad D, Callahan M, Sikora K, Trebst C, Tucky B, Wujek J, Ravid R, Staugaitis SM, Lassmann H, Ransohoff RM (2004) Expression of CCR7 in multiple sclerosis: implications for CNS immunity. *Ann Neurol.*, 55(5):627-38.

Kuenz B, Lutterotti A, Khalil M, Ehling R, Gneiss C, Deisenhammer F, Reindl M, Berger T (2005) Plasma levels of soluble adhesion molecules sPECAM-1, sP-selectin and sE-selectin are associated with relapsing-remitting disease course of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, 167(1-2):143-9.

Lande R, Gafa V, Serafini B, Giacomini E, Visconti A, Remoli ME, Severa M, Parmentier M, Ristori G, Salvetti M, Aloisi F, Coccia EM (2008) Plasmacytoid dendritic cells in multiple sclerosis: intracerebral recruitment and impaired maturation in response to interferon-beta. *J Neuropathol Exp Neurol*, 67(5):388-401.

Lassmann H (1999) The pathology of multiple sclerosis and its evolution. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, 354(1390):1635-40.

Losy J, Niezgodá A, Wender M (1999) Increased serum levels of soluble PECAM-1 in multiple sclerosis patients with brain gadolinium-enhancing lesions. *J Neuroimmunol*, 99(2):169-72.

Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H (2000) Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol.*, 47(6):707-17.

Magliozzi R, Howell O, Vora A, Serafini B, Nicholas R, Puopolo M, Reynolds R, Aloisi F (2007) Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain* , 130(Pt 4):1089-104.

Mathey E, Derfuss T, Storch M, Williams K, Hales K, Woolley DR, Al-Hayani A, Davies SN, Rasbandj MN, Olsson T, Moldenhauer A, Velhin S, Hohlfeld R, Meinl E, Linington C (2007) Neurofascin as a novel target for autoantibody-mediated axonal injury. *J Exp Med.*, 204(10):2363-72.

McCandless E, Piccio L, Woerner B, Schmidt R, Rubin J, Cross AH, Klein RS (2008) Pathological expression of CXCL12 at the blood-brain barrier correlates with severity of multiple sclerosis. *Am J Pathol.*, 172(3):799-808.

McFarland H, Martin R (2007) Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat Immunol.*, 8(9):913-9.

Minagar A, Alexander J (2003) Blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis. *Mult Scler.*, 9(6):540-9.

Minagar A, Jy W, Jimenez J, Sheremata W, Mauro L, Mao WW, Horstman LL, Ahn YS (2001) Elevated plasma endothelial microparticles in multiple sclerosis. *Neurology*, 56(10):1319-24.

Minagar A, Long A, Ma T, Jackson T, Kelley R, Ostanin DV, Sasaki M, Warren AC, Jawahar A, Cappell B, Alexander JS (2003) Interferon (IFN)-beta 1a and IFN-beta 1b block IFN-gamma-induced disintegration of endothelial junction integrity and barrier. *Endothelium* , 10(6):299-307.

Moldovan I, Rudick R, Cotleur A, Born S, Lee J, Karafa MT, Pelfrey CM (2003). Interferon gamma responses to myelin peptides in multiple sclerosis correlate with a new clinical measure of disease progression. *J Neuroimmunol.*, 141(1-2):132-40.

Murugaiyan G, Mittal A, Weiner H (2008) Increased osteopontin expression in dendritic cells amplifies IL-17 production by CD4⁺ T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis and in multiple sclerosis. *J Immunol.*, 181(11):7480-8.

Neumann H, Medana I, Bauer J, Lassmann H (2002) Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases. *Trends Neurosci.*, 25(6):313-9.

Niezgoda A., Losy J (2002) Pecam-1 expression in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Folia Morphol (Warsz.)*, 61(3):143-5.

Ousman S, Tomooka B, van Noort J, Wawrousek E, O'Connor K, Hafler DA, Sobel RA, Robinson WH, Steinman L (2007). Protective and therapeutic role for alphaB-crystallin in autoimmune demyelination. *Nature*, 448(7152):474-9.

Owens G, Bennett J, Lassmann H, O'Connor K, Ritchie A, Shearer A, Lam C, Yu X, Birlea M, DuPree C, Williamson RA, Hafler DA, Burgoon MP, Gilden D (2009) Antibodies produced by clonally expanded plasma cells in multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *Ann Neurol.*, 65(6):639-49.

Park C, Choi Y (2005) How do follicular dendritic cells interact intimately with B cells in the germinal centre? *Immunology*, 114(1):2-10.

Park H, Li Z, Yang X, Chang S, Nurieva R, Wang Y, Wang, YH, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C (2005) A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol.*, 6(11):1133-41.

Pender M, Greer J (2007) Immunology of multiple sclerosis. *Curr Allergy Asthma Rep.*, 7(4):285-92.

Petereit H, Moeller-Hartmann W, Reske D, Rubbert A (2008) Rituximab in a patient with multiple sclerosis--effect on B cells, plasma cells and intrathecal IgG synthesis. *Acta Neurol Scand.*, 117(6):399-403.

Polman C, O'Connor P, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH, Phillips JT, Lublin FD, Giovannoni G, Wajgt A, Toal M, Lynn F, Panzara MA, Sandrock AW, Investigators AFFIRM (2006) A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.*, 354(9):899-910.

Ransohoff R (2009) Immunology: In the beginning. *Nature*, 462(7269):41-2.

Rieckmann P, Altenhofen B, Riegel A, Baudewig J, Felgenhauer K (1997) Soluble adhesion molecules (sVCAM-1 and sICAM-1) in cerebrospinal fluid and serum correlate with MRI activity in multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, 41: 326-33.

Sargsyan S, Shearer A, Ritchie A, Burgoon M, Anderson S, Hemmer B, Stadelmann C, Gattenlöhner S, Owens GP, Gilden D, Bennett JL (2010) Absence of Epstein-Barr virus in the brain and CSF of patients with multiple sclerosis. *Neurology*, 74(14):1127-35.

Saxena A, Martin-Blondel G, Mars L, Liblau R (2011) Role of CD8 T cell subsets in the pathogenesis of multiple sclerosis. *FEBS Lett.*, 585(23):3758-63.

Schreiner B, Mitsdoerffer M, Kieseier B, Chen L, Hartung H, Weller M, Wiendl H (2004) Interferon-beta enhances monocyte and dendritic cell expression of B7-H1 (PD-L1), a strong inhibitor of autologous T-cell activation: relevance for the immune modulatory effect in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.*, 155(1-2):172-82.

Serafini B, Magliozzi R, Rosicarelli B, Reynolds R, Zheng T, Aloisi F (2008) Expression of TWEAK and its receptor Fn14 in the multiple sclerosis brain: implications for inflammatory tissue injury. *J Neuropathol Exp Neurol.*, 67(12):1137-48.

Serafini B, Rosicarelli B, Magliozzi R, Stigliano E, Capello E, Mancardi GL, Aloisi F (2006). Dendritic cells in multiple sclerosis lesions: maturation stage, myelin uptake, and interaction with proliferating T cells. *J Neuropathol Exp Neurol.*, 65(2):124-41.

Serot JM, Bene MC, Foliguet B, Faure GC (2000) Monocyte-derived IL-10-secreting dendritic cells in choroid plexus epithelium. *J Neuroimmunol*, 105(2):115-9.

Silber E, Semra Y, Gregson N, Sharief M (2002) Patients with progressive multiple sclerosis have elevated antibodies to neurofilament subunit. *Neurology*, 58(9):1372-81.

Simpson JE, Newcombe J, Cuzner ML, Woodrooffe MN (1998) Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and other beta-chemokines by resident glia and inflammatory cells in multiple sclerosis lesions. *J Neuroimmunol*, 84(2):238-249.

Skapenko A, Niedobitek G, Kalden J, Lipsky P, Schulze-Koops H (2004) Generation and regulation of human Th1-biased immune responses in vivo: a critical role for IL-4 and IL-10. *J Immunol.*, 172(10):6427-34.

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

Stadelmann C (2011) Multiple sclerosis as a neurodegenerative disease: pathology, mechanisms and therapeutic implications. *Curr Opin Neurol.*, 24(3):224-9.

Steinman L (2009) A molecular trio in relapse and remission in multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol.*, 9(6):440-7.

Stüve O, Leussink V, Fröhlich R, Hemmer B, Hartung H, Menge T, Kieseier BC (2009). Long-term B-lymphocyte depletion with rituximab in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Arch Neurol.*, 66(2):259-61.

Takata F, Dohgu S, Matsumoto J, Takahashi H, Machida T, Wakigawa, T, Harada E, Miyaji H, Koga M, Nishioku T, Yamauchi A, Kataoka Y (2011) Brain pericytes among cells constituting the blood-brain barrier are highly sensitive to tumor necrosis factor- α , releasing matrix metalloproteinase-9 and migrating in vitro. *J Neuroinflammation*, 8:106.

Trebst C, Ransohoff R (2001) Investigating chemokines and chemokine receptors in patients with multiple sclerosis: opportunities and challenges. *Arch Neurol.*, 58(12):1975-80.

Tzartos J, Friese M, Craner M, Palace J, Newcombe J, Esiri MM, Fugger L (2008) Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol*, 172(1):146-55.

van der Laan LJ, Ruuls SR, Weber KS, Lodder, IJ, Dopp EA, Dijkstra CD (1996) Macrophage phagocytosis of myelin in vitro determined by flow cytometry: phagocytosis is mediated by CR3 and induces production of tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide. *J. Neuroimmunol.*, 70(2):145-52.

Veldhoen M, Hocking R, Atkins C, Locksley R, Stockinger B (2006) TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* , 24(2):179-89.

Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner H, Hafler D (2004) Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med.*, 199(7):971-9.

Waubant E, Goodkin D, Gee L, Bacchetti P, Sloan R, Stewart T, Andersson PB, Stabler G, Miller K (1999) Serum MMP-9 and TIMP-1 levels are related to MRI activity in relapsing multiple sclerosis. *Neurology*, 53(7):1397-401.

Weber M, Prod'homme T, Patarroyo J, Molnarfi N, Karnezis T, Lehmann-Horn K, Danilenko DM, Eastham-Anderson J, Slavin AJ, Linington C, Bernard CCA, Martin F, Zamvil

SS (2010) B-cell activation influences T-cell polarization and outcome of anti-CD20 B-cell depletion in central nervous system autoimmunity. *Ann Neurol.*, 68(3):369-83.

Weiner H (2008) A shift from adaptive to innate immunity: a potential mechanism of disease progression in multiple sclerosis. *J Neurol.*, 255 Suppl 1:3-11.

Weiner H (2009) The challenge of multiple sclerosis: how do we cure a chronic heterogeneous disease? *Ann Neurol.*, 65(3):239-48.

Zozulya AL, Clarkson BD, Ortler S, Fabry Z, Wiendl H (2010) The role of dendritic cells in CNS autoimmunity. *J Mol Med (Berl)*, 88(6):535-44.

ANEXO 1 - Resumo das características dos artigos seleccionados.

Autores	Ano	Tipo de estudo
Acosta-Rodriguez	2007	Investigação experimental (<i>In vitro</i>)
Aloisi & Pujol-Borrell	2006	Revisão
Aloisi <i>et al.</i>	1998	Investigação experimental (<i>in vitro</i>)
Archelos <i>et al.</i>	2000	Revisão
Bar-Or	2008	Revisão
Bar-Or <i>et al.</i>	2010	Caso-controlo
Bartos <i>et al.</i>	2007	Caso-controlo
Becher <i>et al.</i>	2001	Investigação experimental (EAE)
Berger <i>et al.</i>	1999	Investigação experimental (<i>In vitro</i>)
Boje & Lakhman	2000	Investigação experimental
Breij <i>et al.</i>	2008	Caso-controlo
Cepok <i>et al.</i>	2005	Caso-controlo

Chastain, <i>et al.</i>	2010	Revisão
Correale <i>et al.</i>	1995	Caso-controlo
Cross <i>et al.</i>	2006	Ensaio Clínico de fase II
DeAngelis & Lublin	2008	Revisão
Fabrick <i>et al.</i>	2005	Caso-controlo
Fainardi <i>et al.</i>	2006	Caso-controlo
Farina, <i>et al.</i>	2007	Revisão
Franciotta <i>et al.</i>	2008	Revisão
Frischer <i>et al.</i>	2009	Caso-controlo
Gandhi, <i>et al.</i>	2010	Revisão
Giovannoni <i>et al.</i>	1997	Coorte
Gray, <i>et al.</i>	2008	Caso-controlo
Harp <i>et al.</i>	2010	Caso-controlo
Hauser <i>et al.</i>	2008	Ensaio Clínico de fase II
Hemmer <i>et al.</i>	2002	Revisão
Huang <i>et al.</i>	1999	Caso-controlo
Hur <i>et al.</i>	2007	Caso-controlo

Ireland & Monson	2011	Revisão
Jacobsen, <i>et al.</i>	2002	Caso-controlo
Karman, <i>et al.</i>	2004	Investigação experimental (<i>In vivo</i>)
Karni <i>et al.</i>	2006	Caso-controlo
Kasper & Shoemaker	2010	Revisão
Khrestchatisky <i>et al.</i>	2003	Revisão
Kivisakk, <i>et al.</i>	2004	Investigação experimental (material de autópsia)
Kuenz <i>et al.</i>	2005	Caso-controlo
Lande, <i>et al.</i>	2008	Coorte
Lassmann	1999	Revisão
Losy <i>et al.</i>	1999	Caso-controlo
Lucchinetti <i>et al.</i>	2000	Caso-controlo
Magliozzi	2007	Investigação experimental (material de autópsia)
Mathey <i>et al.</i>	2007	Caso-controlo
McCandless <i>et al.</i>	2008	Caso-controlo

McFarland & Martin	2007	Revisão
Minagar & Alexander	2003	Revisão
Minagar <i>et al.</i>	2001	Caso-controlo
Minagar <i>et al.</i>	2003	Investigação experimental (<i>in vitro</i>)
Moldovan <i>et al.</i>	2003	Investigação experimental (<i>In vitro</i>)
Murugaiyan <i>et al.</i>	2008	Investigação experimental (EAE) e Caso-controlo
Neumann <i>et al.</i>	2002	Revisão
Niezgoda & Losy	2002	Caso-controlo
Ousman <i>et al.</i>	2007	Investigação experimental (EAE)
Owens <i>et al.</i>	2009	Caso-controlo (<i>in vitro</i>)
Park & Choi	2005	Revisão
Park <i>et al.</i>	2005	Investigação experimental (<i>In vivo e in vitro</i>)
Pender & Greer	2007	Revisão
Petereit <i>et al.</i>	2008	Estudo de caso

Polman <i>et al.</i>	2006	Ensaio clínico
Ransohoff	2009	Revisão
Rieckmann <i>et al.</i>	1997	Caso-controlo
Sargsyan	2010	Caso-controlo
Saxena, <i>et al.</i>	2011	Revisão
Schreiner <i>et al.</i>	2004	Caso-controlo
Serafini, <i>et al.</i>	2006	Investigação experimental (material de autópsia)
Serafini, <i>et al.</i>	2008	Caso-controlo
Serot, <i>et al.</i>	2000	Investigação experimental (material de autópsia)
Silber <i>et al.</i>	2002	Caso-controlo
Simpson, <i>et al.</i>	1998	Caso-controlo
Skapenko <i>et al.</i>	2004	Investigação experimental (<i>In vivo</i>)
Sospedra & Martin	2005	Revisão
Stadelmann	2011	Revisão
Steinman	2009	Revisão

Stüve <i>et al.</i>	2009	Séries de casos
Takata <i>et al.</i>	2011	
Trebst & Ransohoff	2001	Revisão
Tzartos, <i>et al.</i>	2008	Caso-controlo
Van der Laan <i>et al.</i>	1996	Investigação experimental (<i>In vitro</i>)
Veldhoen <i>et al.</i>	2006	Investigação experimental (<i>In vitro</i>)
Viglietta <i>et al.</i>	2004	Caso-controlo
Waubant <i>et al.</i>	1999	Coorte
Weber, <i>et al.</i>	2010	Investigação experimental (EAE)
Weiner	2008	Revisão
Weiner	2009	Revisão
Zolulya, <i>et al.</i>	2010	Revisão