

ANÁLOGO DA MITOXANTRONA MELHORA A ENCEFALOMIELITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL ATRAVÉS DO AUMENTO DAS CITOCINAS IL-17A/IL-10 E INIBIÇÃO DA QUIMIOCINA CCL5

Alyria Teixeira Dias^{*}
Chrystian Junqueira Alves^{**}
Caio César Souza Alves^{***}
Sandra Bertelli Ribeiro de Castro^{****}
Lívia Leite Alves^{*****}
Cristiane França da Costa^{*****}
Mauro Vieira de Almeida^{*****}
Henrique Couto Teixeira^{*****}
Ana Paula Ferreira^{*****}

RESUMO

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença inflamatória de etiologia autoimune, com resposta imunológica contra proteínas de mielina do cérebro e da medula espinhal. É a doença humana desmielinizante do sistema nervoso central (SNC) mais comum, que atinge 1,4 milhão de pessoas em todo o mundo. Um grande número de citocinas e quimiocinas têm um papel central no estabelecimento e manutenção de doenças autoimunes, atuando em redes de alta complexidade e diferentes tipos de células. A mitoxantrona (MIT) é um medicamento aprovado para o tratamento das várias formas de EM nos Estados Unidos da América e Europa, sendo um agente antineoplásico, cuja eficácia no tratamento da esclerose múltipla é creditado à inibição da proliferação de células T, células B e macrófagos. O tratamento com a MIT, dependendo da dose total acumulada, provoca efeitos colaterais adversos, tais como o desenvolvimento de cardiotoxicidade crônica. Neste estudo, foi investigado os efeitos clínicos e imunológicos de N, N'-didodecanoil-1,4-diaminoantraquinona [DDAAQ], um análogo lipofílico da MIT, no modelo de Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE) induzido por MOG. Camundongos

* Graduanda em Farmácia – UFJF – Bolsista de Iniciação Científica (PIBIC/CNPq)
** Graduando em Ciências Biológicas – UFJF – Bolsista de Iniciação Científica (BIC/UFJF)
*** Doutorando em Saúde Brasileira - UFJF
**** Doutorando em Saúde Brasileira - UFJF
***** Graduanda em Farmácia – UFJF – Bolsista de Iniciação Científica (PIBIC/CNPq)
***** Doutoranda em Química - UFJF
***** Professor do Departamento de Química - UFJF
***** Professor do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia - UFJF
***** Professora Orientadora do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFJF
Juiz de Fora, Minas Gerais. e-mail: ana.paula@ufjf.edu.br endereço: Campus Universitário, Laboratório de Imunologia, Bairro Martelos, Juiz de Fora

C57Bl/6 fêmeas foram imunizados ou não por via subcutânea em ambos os lados da base da cauda com 100 mg do peptídeo MOG35-55. Os camundongos foram pesados e observados diariamente para avaliação dos sinais clínicos da EAE até 21 dias pós-imunização (dpi). Camundongos imunizados receberam 1 mg/kg de peso da mitoxantrona ou análogo DDAAQ por via intraperitoneal diariamente, entre 14 a 21 dpi. Aos 21 dpi os camundongos foram sacrificados, os cérebros removidos e os hemisférios homogeneizados e os sobrenadantes foram coletados para determinação da concentração de IL-10, IL-17A e CCL5. Os camundongos imunizados apresentaram sinais de EAE, tais como fraqueza ou paralisia da cauda e dos membros, bem como perda de peso corporal. As injeções intraperitoneais de DDAAQ foram eficazes no tratamento de camundongos induzidos com EAE (grupo DDAAQ), mostrando diferença acentuada no escore clínico quando comparado aos camundongos imunizados com EAE e não tratados (grupo EAE). O grupo tratado com DDAAQ apresentou um aumento na produção de IL-17A e de IL-10 e uma diminuição na produção da quimiocina CCL5 no CNS. Os resultados sugerem que um dos mecanismos responsáveis pelo efeito clínico deste composto pode estar relacionado à indução de células Th17 reguladoras através de redução da migração celular para o SNC.

Palavras-chave: Esclerose múltipla. EAE. Mitoxantrona. IL-17A. IL-10. CCL5.

1 Introdução

A Esclerose Múltipla (EM) caracteriza-se por ser uma doença inflamatória crônica desmielinizante do Sistema Nervoso Central (SNC) de natureza autoimune, sendo na maioria dos casos grave e incapacitante. Ela atinge cerca de 1,4 milhões de pessoas em todo o mundo (PUGLIATTI et al., 2002) e possui fatores genéticos e ambientais envolvidos na sua etiologia (STEINMAN, 2001; SOSPEDRA; MARTIN, 2005; HAUSER; OKSENBERG, 2006). Alguns estudos mostram que um grande número de citocinas e quimiocinas apresentam um papel central no estabelecimento e manutenção de doenças autoimunes, tal como a EM, atuando em redes de alta complexidade e em diferentes tipos de células, exercendo muitas vezes funções redundantes (SZCZUCINSKI; LOSY, 2007; HEDEGAARD et al., 2008).

A interleucina (IL) -17A está envolvida na EM, na qual estimula a produção de certas quimiocinas pelas células endoteliais (WOLTMAN et al., 2000), aumenta a permeabilidade da barreira hematoencefálica (KEBIR et al., 2007), neutraliza a atividade das células T reguladoras (TSAKNARIDIS et al., 2003) e estimula a produção de IL-6 por macrófagos através de “feedback” positivo (YAO et al., 1995; JOVANOVIC et al., 1998). Como a IL-17A, a quimiocina CCL5 desempenha um papel importante no desenvolvimento da inflamação pela sua capacidade quimiotática de leucócitos e capacidade de modular suas funções. Além disso, a CCL5 tem sido relacionada à patogênese da EM, sendo sua expressão observada em focos inflamatórios perivascularares no cérebro (HVAS; BERNARD, 1998). Por outro lado, a IL-10 apresenta um perfil oposto ao perfil inflamatório induzido pela IL-17A, sendo considerada uma citocina imunossupressora, produzida por muitos tipos de células T. Além disso, vários subconjuntos de células T reguladoras produzem IL-10, e sua função em doenças autoimunes é controlar a progressão de danos causados pelas células auto-reativas (BEEBE et al., 2002).

A mitoxantrona (MIT), é um medicamento aprovado para o tratamento da leucemia aguda e de várias formas de EM nos Estados Unidos da América e da Europa (HARTUNG et al., 2002; NEUHAUSET al., 2006), é um agente anticancerígeno, cuja eficácia no tratamento da esclerose múltipla é creditada à capacidade de inibir a proliferação de células T, células B e macrófagos (FIDLER et al., 1986; LEVINE; GHERSON, 1986; WANG et al., 1986). O tratamento com a MIT normalmente causa mielossupressão aguda. No entanto, dependendo da dose total acumulada, vários efeitos adversos

podem ser associados, tais como o desenvolvimento de cardiotoxicidade crônica (GONSETTE, 1996; AVASARALA et al., 2003; GALETTA; MARKOWITZ, 2005; FOX, 2006).

Neste estudo, foram investigados os efeitos clínicos e de regulação da resposta imunológica pelo N,N'-didodecanoil-1,4-diaminoantraquinona [DDAAQ], um análogo lipofílico da mitoxantrona no modelo de Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE).

2 Metodologia

Compostos químicos

A mitoxantrona (MIT, Fig. 1A) foi gentilmente cedida pela “Quiral Química do Brasil S.A.”. O análogo da Mitoxantrona, N,N'-didodecanoil-1,4-diaminoantraquinona (DDAAQ) foi preparado por reação da 1,4 diaminoantraquinona com cloreto de dodecanoil dimetilacetamida e piridina (Fig. 1C-B, respectivamente).

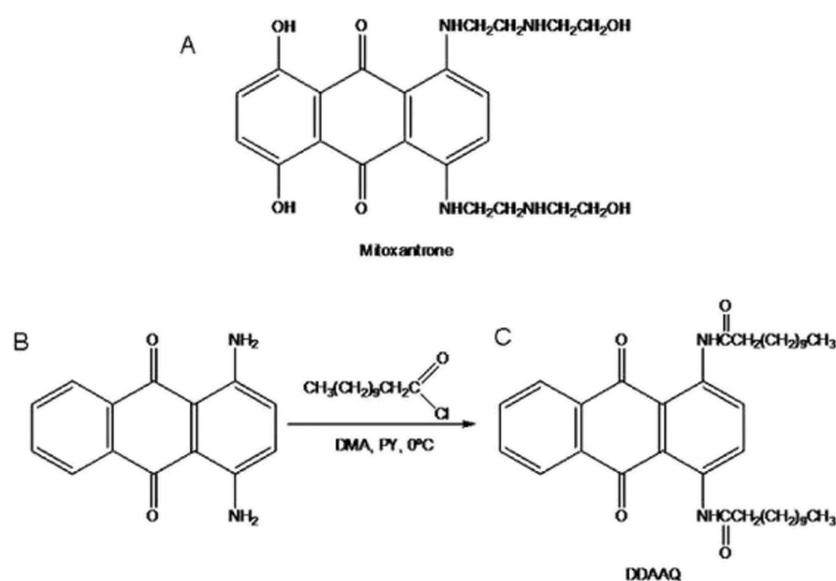


Fig. 1: Estrutura química: A) mitoxantrona, B) 1,4 diaminoantraquinona C) DDAAQ

Animais

Camundongos C57Bl/6 fêmeas com 8-10 semanas de idade foram obtidos do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) e alojados em gaiolas micro-isoladoras no biotério do Laboratório de Imunologia (ICB/UFJF). Todos os procedimentos foram de acordo com os princípios do Código Brasileiro para o Uso de Animais de Laboratório. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética sobre o uso de animais de laboratório da UFJF (protocolo número 006/2008).

Indução da EAE

Grupos de 5-6 camundongos foram imunizados por via subcutânea (sc) ou não em ambos os lados da base da cauda com 100 mg de MOG₃₅₋₅₅ peptídeo (Sigma Chemical Co., Saint Louis, E.U.A.) emulsionado em adjuvante completo de Freund (CFA) (Sigma) suplementado com 400 mg *Mycobacterium tuberculosis* atenuado, cepa H37RA (Difco, Detroit, E.U.A.). Toxina pertussis, 300 ng/animal (Sigma), foi injetada por via intraperitoneal (ip) no dia da imunização e novamente 48 horas depois. O experimento envolveu 4 grupos de animais: (i) controle, não induzido; (ii) induzidos, não

tratados (EAE); (iii) induzidos, tratados com MIT; (iiii) induzidos, tratados com DDAAQ. Os animais foram monitorados diariamente e o comprometimento neurológico foi avaliado.

Avaliação clínica

Os camundongos foram pesados e observados diariamente quanto aos sinais clínicos da EAE até 21 dias pós-imunização (dpi). A avaliação clínica foi individual de acordo com a Tabela 1 (De PAULA et al., 2008). O escore clínico final foi obtido adicionando todos os valores individuais avaliados.

Tratamento com MIT e DDAAQ

Camundongos imunizados foram divididos em três grupos. Um não recebeu nenhum tratamento (grupo EAE), enquanto os outros receberam 1 mg/kg de peso da mitoxantrona (grupo MIT) ou análogo DDAAQ (grupo DDAAQ) em dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma) 10% i.p. por dia (LUBLIN et al., 1987; De PAULA et al., 2008). O tratamento foi introduzido no 14 dpi e mantido durante 7 dias.

Avaliação da produção de IL-10, IL-17A e CCL5 no SNC

Extratos de tecidos do cérebro foram adquiridos de camundongos controle e imunizados, que foram sacrificados por overdose de ketamina e xilazina i.p. aos 21 dpi. Os cérebros foram removidos e os hemisférios foram homogeneizados em solução de extração (100 mg de tecido por 1 mL), contendo: 0,4 M NaCl, 0,05% de Tween 20 (Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, E.U.A.), 0,5% de soro albumina bovina (BSA), 0,1 M fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF), 0,1 M de cloreto de benzetônio, 10 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e 20 kIU/mL de aprotinina (Sigma), utilizando Ultra-Turrax (IKA Works, Wilmington, E.U.A.). O sobrenadante do homogenato de cérebro foi coletado para determinar a concentração de IL-10, IL-17A e CCL5, na diluição de 1:10 em 1% BSA em tampão fosfato salino (PBS). As concentrações foram analisadas por ELISA de acordo com os procedimentos fornecidos pela fabricante dos anticorpos (BD Biosciences PharMingen, San Diego, E.U.A.).

Análise estatística

Os resultados representam pelo menos dois experimentos independentes e são apresentados como média \pm SEM. Para análise do escore clínico e dos pesos dos animais foram utilizados two-way ANOVA, enquanto os paramétricos foram avaliados por ANOVA one-way. Todas as análises foram seguidas pelo teste Bonferroni de comparação múltipla (GraphPad Prism 5.00), e as diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

3 Resultados

O tratamento com DDAAQ melhora o curso clínico da EAE

O curso clínico da EAE foi avaliado através do peso e escore clínico dos animais, tais como, fraqueza ou paralisia da cauda e dos membros, bem como perda de peso corporal, que se tornou aparente em torno de 10-12 dias após a imunização. As injeções de ambos, DDAAQ e MIT, não influenciou o peso diário, quando comparado aos animais do grupo EAE (Fig. 2A). A administração de DDAAQ demonstrou ser eficaz no tratamento da EAE induzida por MOG35-55 em camundongos. O escore clínico da EAE nos grupos tratados (DDAAQ e MIT) teve o pico no 14º dia após a imunização, enquanto o grupo não tratado (grupo EAE) atingiu o pico no 18º

dia (Fig. 2B). A partir do dia 16, os grupos tratados DDAAQ e MIT apresentaram diferenças pronunciadas no escore clínico, quando comparado ao grupo EAE ($p < 0,05$).

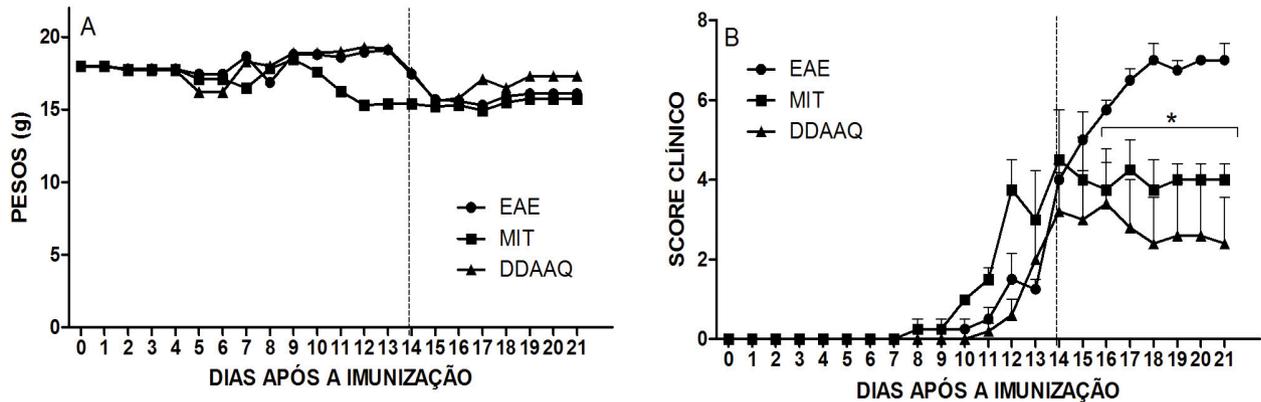


Fig. 2: Escore clínico e avaliação de peso. Os animais foram monitorados diariamente quanto aos sinais clínicos de EAE depois da imunização com 100µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅. (A) Avaliação de peso de animais com EAE tratados ou não com MIT ou DDAAQ. (B) Escore clínico de animais com EAE tratados ou não com MIT ou DDAAQ. Cada ponto representa a média aritmética ± SEM, e os resultados são representativos de dois diferentes experimentos. Linha pontilhada, começo do tratamento. *, $p < 0,05$ quando comparado MIT ou DDAAQ com EAE.

Níveis de IL-17A e IL-10 no sobrenadante do macerado de cérebro

Os níveis das citocinas IL-17A e IL-10 foram determinados no sobrenadante de macerados do cérebro no 21º dia pós-imunização. Os grupos de camundongos DDAAQ e MIT mostraram um aumento da produção de IL-17 e IL-10 (Fig. 3A e B, respectivamente), quando comparado ao grupo EAE ($P < 0,05$).

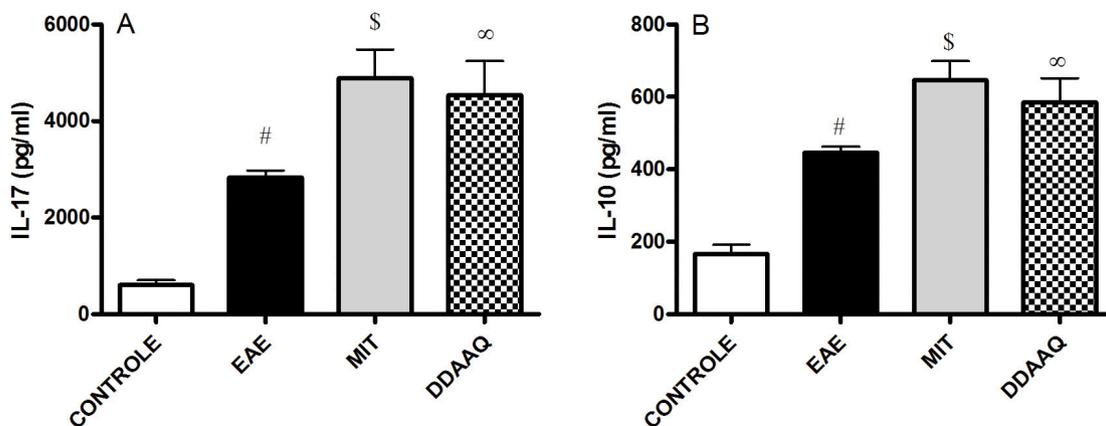


Fig. 3: Níveis de IL-17A e IL-10 no sobrenadante de macerados do cérebro de animais com EAE. Concentração de 17A (A) e IL-10 (B). Cada barra representa a média aritmética ± SEM, e os resultados são representativos de dois experimentos diferentes. # EAE comparado com controle; \$ MIT comparado a EAE; ∞ DDAAQ comparado a EAE, $p < 0,05$.

Níveis da quimiocina CCL5 no sobrenadante do macerado de cérebro

Os níveis da quimiocina CCL5 foram quantificados no sobrenadante de macerado de cérebro no 21º dia pós-imunização. O grupo de camundongos DDAAQ apresentou uma liberação de CCL5 diminuída (Fig. 4), quando comparado ao grupo EAE ($p < 0,05$). O grupo MIT não apresentou diferença estatística na produção de CCL5, quando comparado ao grupo EAE.

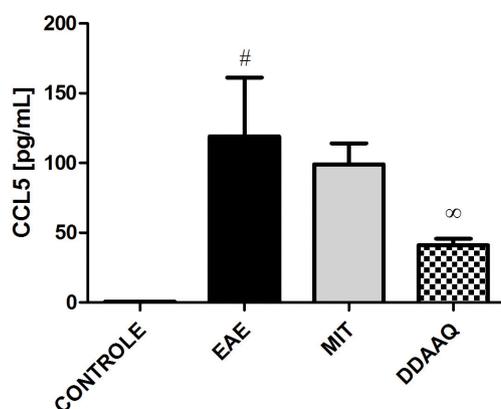


Fig. 4: Níveis da quimiocina CCL5 no sobrenadante de macerados do cérebro de animais com EAE. Cada barra representa a média aritmética +/- SEM, e os resultados são representativos de dois experimentos diferentes. # EAE comparado com controle; ∞ DDAAQ comparado a EAE, $p < 0,05$.

4 Discussão e conclusão

As terapias para impedir o curso da EM ainda são ineficazes quanto a diminuir os danos e a incapacidade causada pela doença. As falhas observadas na terapêutica atual têm sido relacionadas à ineficiência do tratamento para promover a cura ou a recuperação dos pacientes que se encontram na fase avançada da doença (PIAO et al., 2007). Por se tratar de uma doença autoimune, uma das estratégias para o tratamento é a exclusão de populações de células T auto-agressivas e as terapias disponíveis são primariamente baseadas no uso de imunomoduladores ou imunossupressores.

A EAE é o modelo animal mais amplamente utilizado no estudo da EM e foi inicialmente caracterizada como uma doença mediada por linfócitos $CD4^+$ T helper 1 (Th1) e produção de citocinas pró-inflamatórias relacionadas a este tipo celular, como $IFN-\gamma$ e IL-12 (MARCONDES et al., 2005; SOSPEDRA et al., 2005; WENSKY, 2005; De PAULA et al., 2008). Estudos posteriores mostraram também a influência de linfócitos T helper 17 (Th17), através da produção da citocina pró-inflamatória IL-17 (LAURENCE; O' SHEA, 2007). Recentemente, foram propostos novos subtipos de células Th17, classificados como patogênicas e reguladoras: a Th17 patogênica é caracterizada pela produção de IL-17, IL-12 e $IFN-\gamma$, enquanto a Th17 reguladora produz IL-17 e IL-10. Neste último caso a IL-10 produzida será responsável pela regulação da EAE, melhorando os sinais clínicos da doença (McGEACHY et al., 2007; IMLER; PETRO Jr, 2009).

Os resultados aqui apresentados demonstram que o tratamento com DDAAQ melhorou os sinais clínicos da doença EAE induzida em camundongos e promoveu um aumento de IL-17A e IL-10, além da diminuição da liberação da quimiocina CCL5 no CNS. Camundongos induzidos e tratados com DDAAQ apresentaram uma redução dos sinais clínicos comparados aos animais tratados com a MIT, sugerindo que o tratamento com DDAAQ induz um perfil caracterizado por células Th17 imunoreguladoras (Th17reg). Além disso, a redução da CCL5 pode estar relacionada com uma baixa migração de células Th1 para o SNC e também pode ser associada com a melhora dos sinais da EAE (GLABINSKI et al., 2002; JALOSINSKI et al., 2008).

Portanto, os efeitos do DDAAQ apresentados, quando comparados aos efeitos da mitoxantrona, sugerem que o principal mecanismo responsável pelos efeitos clínicos deste composto são, ativação de células Th17 reguladoras e redução da migração celular para o sistema nervoso central. No entanto, são necessários estudos adicionais para verificar a eficácia, segurança e riscos toxicológicos na esclerose múltipla.

Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado por benefícios do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) protocolo número 481797/07-6, da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

MITOXANTRONE ANALOGUE IMPROVES EAE THROUGH THE INCREASE OF IL-17/IL-10 AND INHIBITION OF CCL5

ABSTRACT

Multiple Sclerosis (MS) is an autoimmune inflammatory disease directed against myelin proteins of the brain and spinal cord and is the most common human demyelinating disease of the central nervous system (CNS) that afflicts 1.4 million worldwide. A large number of cytokines and chemokines play pivotal roles in the establishment and maintenance of autoimmune disorders, acting in highly complex networks, and different cell types often exert overlapping and in part redundant functions. Mitoxantrone (MIT), approved for the treatment of several forms of MS in the United States of America and Europe, is an anticancer agent whose efficacy in treating MS is believed to be due to inhibition of the proliferation of T cells, B cells, and macrophages. The treatment with MIT, depending on the total cumulative dose, causes several side effects, such as the development of chronic cardiotoxicity. Therefore, there is a need to develop effective and less toxic drugs with particular reference to cardiotoxicity. In this study, we investigate the clinical and immunological effects of N,N'-didodecanoyl-1,4-diaminoanthraquinone [DDAAQ], a lipophilic mitoxantrone analogue, on the myelin MOG-induced Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) model. Female C57BL/6 mice were subcutaneously (s.c.) immunized or not at both sides of the tail base with 100 µg of MOG 35–55 peptide. Mice were weighed and observed daily for clinical signs of EAE up to 21 days post-immunization (dpi). Immunized mice were given 1 mg/kg body weight of mitoxantrone or mitoxantrone analogue DDAAQ i.p. daily, between the 14th dpi to 21st dpi. At the 21st dpi mice were sacrificed, brains were removed and hemispheres were homogenized in extraction solution, centrifuged and supernatants were collected to determine the concentration of IL-10, IL-17A and CCL5. The immunized mice presented EAE signs such as weakness or paralysis of their tail and limbs as well as loss of body weight, which became apparent around days 10–12 following immunization. Intraperitoneal injections of DDAAQ demonstrated to be effective in treating EAE mice, showing, from day 16, pronounced differences in clinical score when compared to non treated EAE mice. DDAAQ treated group showed an increase of IL-17 and IL-10 production and a decrease of CCL5 release at CNS. The presents results suggests that the major mechanism responsible for clinical effects of this compound are immunological mechanisms such as activation of Th17 regulatory cells and the reduction of cellular enrollment for CNS.

Keywords: Multiple sclerosis. EAE. Mitoxantrone.

Referências

AVASARALA, J.R.; CROSS, A.H.; CLIFFORD, D.B.; SINGER, B.A.; SIEGEL, B.A.; ABBEY, E.E. Rapid onset mitoxantrone-induced cardiotoxicity in secondary progressive multiple sclerosis. **Mult Scler**, v. 9, p. 59-62, 2003.

De PAULA, M.L.; RODRIGUES, D.H.; TEIXEIRA, H.C.; BARSANTE, M.M.; SOUZA, M.A.; FERREIRA, A.P. Genistein down-modulates pro-inflammatory cytokines and reverses clinical signs of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Int Immunopharmacol.**, v. 8, no. 9, p. 1291-1297, 2008.

FIDLER, J.M.; DEJOY, S.Q.; GIBBONS JR, J.J. Selective immunomodulation by the antineoplastic agent mitoxantrone: I. Suppression of B lymphocyte function. **J Immunol**, v. 137, p. 727-732, 1986.

FIDLER, J.M.; DEJOY, S.Q.; SMITH III, F.R.; GIBBONS JR, J.J. Selective immunomodulation by the antineoplastic agent mitoxantrone: II. Nonspecific adherent suppressor cells derived from mitoxantrone-treated mice. **J Immunol**, v. 136, p. 2747-2754, 1986.

FOX, E.J. Management of worsening multiple sclerosis with mitoxantrone: a review. **Clin Ther**, v. 28, p. 461-474, 2006.

GALETTA, S.L.; MARKOWITZ, C. US FDA-approved disease-modifying treatments for multiple sclerosis: review of adverse effect profiles. **CNS Drugs**, v. 19, p. 239-252, 2005.

GLABINSKI, A.R.; BIELECKI, B.; O'BRYANT, S.; SELMAJ, K.; RANSOHOFF, R.M. Experimental autoimmune encephalomyelitis: CC chemokine receptor expression by trafficking cells. **J Autoimmun.**, v. 19, no. 4, p. 175-181, 2002.

GONSETTE, R.E. Mitoxantrone immunotherapy in multiple sclerosis. **Mult Scler**, v. 1, p. 329-332, 1996.

HARTUNG, H.P.; GONSETTE, R.; KONIG, N.; KWIECINSKI, H.; GUSEO, A.; MORRISSEY, S.P.; Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: a placebo-controlled, double-blind, randomised, multicentre trial. **Lancet**, v. 360, p. 2018-2025, 2002.

HAUSER, S.L.; OKSENBERG, J.R. The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration. **Neuron**, v. 52, p. 61-76, 2006.

HEDEGAARD, C.J.; KRAKAUER, M.; BENDTZEN, K.; LUND, H.; SELLEBJERG, F.; NIELSEN, C.H. T helper cell type 1 (Th1), Th2 and Th17 responses to myelin basic protein and disease activity in multiple sclerosis. **Immunol**, v. 125, n. 2, p. 161-169, 2008.

HVAS, J.; BERNARD, C.C. Molecular detection and quantitation of the chemokine RANTES mRNA in neurological brain. **Apmis**, v. 106, p. 598-604, 1998.

BEEBE, A.M.; CUA, D.J.; DE WAAL MALEFYT, R. The role of interleukin-10 in autoimmune disease: systemic lupus erythematosus (SLE) and multiple sclerosis (MS). **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 13, no. 4, p.:403-412, 2002.

IMLER, T.J.; JR, PETRO, T.M. Decreased severity of experimental autoimmune encephalomyelitis during resveratrol administration is associated with increased IL-17+IL-10+ T cells, CD4(-) IFN-gamma+ cells, and decreased macrophage IL-6 expression. **Int Immunopharmacol.**, v. 9, no. 1, p. 134-143, 2009.

JALOSINSKI, M.; KAROLCZAK, K.; MAZUREK, A.; GLABINSKI, A. The effects of methylprednisolone and mitoxantrone on CCL5-induced migration of lymphocytes in multiple sclerosis. **Acta Neurol Scand.**, v. 118, no. 2, p. 120-125, 2008.

JOVANOVIC, D.V.; DI BATTISTA, J.A.; MARTEL-PELLETIER, J.; JOLICOEUR, F.C.; HE, Y.; ZHANG, M.; IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL- β and TNF- α , by human macrophages. **J Immunol**, v. 160, no. 7, p. 3513-3521, 1998.

KEBIR, H.; KREYMBORG, K.; IFERGAN, I.; DODELET-DEVILLERS, A.; CAYROL, R.; BERNARD, M.; Human T(H)17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. **Nat Med**, v. 13, no. 10, p. 1173-1175, 2007.

LAURENCE, A.; O'SHEA, J.J. T(H)-17 differentiation: of mice and men. **Nat Immunol.**, v. 8, no. 9, p. 903-905, 2007.

LEADBETTER, E.A.; BOURQUE, C.R.; DEVAUX, B.; OLSON, C.D.; SUNSHINE, G.H.; HIRANI, S.; Experimental autoimmune encephalomyelitis induced with a combination of myelin basic protein and myelin oligodendrocyte glycoprotein is ameliorated by administration of a single myelin basic protein peptide. **J Immunol**, v. 161, p. 504-512, 1998.

LEVINE, S.; GHERSON, J. Morphologic effects of mitoxantrone and a related anthracenedione on lymphoid tissues. **Int J Immunopharmacol**, v. 8, p. 999-1007, 1986.

LUBLIN, F.D.; LAVASA, M.; VITI, C.; KNOBLER, R.L. Suppression of acute and relapsing experimental allergic encephalomyelitis with mitoxantrone. **Clin Immunol Immunopathol**, v. 45, no. 1, p. 122-128, 1987.

MARCONDES, M.C.; FURTADO, G.C.; WENSKY, A.; LAFAILLE, M. A. C.; FOX, H.S.; LAFAILLE, J.J. Immune Regulatory Mechanisms Influence Early Pathology in Spinal Cord Injury and in Spontaneous Autoimmune Encephalomyelitis. **American Journal of Pathology**, v.166, p.1749-1760, 2005.

McGEACHY, J.S.; BAK-JENSEN, K.S.; CHEN, Y.; TATO, C.M.; BLUMENSCHNEIN, W.; MCCLANAHAN, T.; TGF- β and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain TH-17 cell-mediated pathology. **Nat Immunol.**, v. 8, no. 12, p.1390-1397, 2007.

NEUHAUS, O.; KIESEIER, B.C.; HARTUNG, H.P. Mitoxantrone in multiple sclerosis. **Adv Neurol**, v. 98, p. 293-302, 2006.

PIAO, W.H.; WONG, R.; BAI, X.F.; HUANG, J.; CAMPAGNOLO, D.I.; DORR, R.T.; Therapeutic effect of anthracene-based anticancer agent ethonafide in an animal model of multiple sclerosis. **J Immunol.**, v. 179, no. 11, p. 7415-7423, 2007.

PUGLIATTI, M.; SOTGIU, S.; ROSATI, G. The worldwide prevalence of multiple sclerosis. **Clin Neurol Neurosurg**, v. 104, no. 3, p. 182-191, 2002.

SOSPEDRA, M.; MARTIN, R. Immunology of Multiple Sclerosis. **Annual Review of Immunology**, v.23, p.683-747, 2005.

- STEINMAN, L. Multiple sclerosis: a two-stage disease. **Nat Immunol**, v. 2, p. 762-764, 2001.
- SZCZUCINSKI, A.; LOSY, J. Chemokines and chemokine receptors in multiple sclerosis. Potential targets for new therapies. **Acta Neurol Scand**, v. 115, p. 137-146, 2007.
- TSAKNARIDIS, L.; SPENCER, L.; CULBERTSON, N.; HICKS, K.; LATOCHA, D.; CHOU, Y.K.; Functional assay for human CD4+CD25+ Treg cells reveals an age-dependent loss of suppressive activity. **J Neurosci Res**, v. 74, no. 2, p. 296-308, 2003.
- WENSKY, A.K.; FURTADO, G.C.; MARCONDES, M.C.G.; CHEN, S.; MANFRA, D.; LIRA, S. A.; ZAGZAG, D.; LAFAILLE, J.J. IFN- γ Determines Distinct Clinical Outcomes in Autoimmune Encephalomyelitis. **The Journal of Immunology**, v.174, p.1416-1423, 2005.
- WOLTMAN, A.M.; DE HAIJ, S.; BOONSTRA, J.G.; GOBIN, S.J.; DAHA, M.R.; VAN KOOTEN, C. Interleukin-17 and CD40-ligand synergistically enhance cytokine and chemokine production by renal epithelial cells. **J Am Soc Nephrol**, v. 11, no. 11, p. 2044-2055, 2000.
- YAO, Z.; FANSLOW, W.C.; SELDIN, M.F.; ROUSSEAU, A.M.; PAINTER, S.L.; COMEAU, M.R.; Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. **Immunity**, v. 3, no. 6, p. 811-821, 1995.
- WANG, B.S.; LUMANGLAS, A.L.; SILVA, J.; RUSZALA-MALLON, V.M.; DURR, F.E. Inhibition of the induction of alloreactivity with mitoxantrone. **Int J Immunopharmacol**, v. 8, p. 967-973, 1986.