UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

VANIA ALICE DE AGUIAR MENDES

**INDUÇÃO DA NEURITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL
(NAE) EM CAMUNDONGOS SJL/J ATRAVÉS DE
INJEÇÃO DE PROTEÍNA P2 DA MIELINA DO NERVO
PERIFÉRICO (MNP).**

Ribeirão preto

2012

VÂNIA ALICE DE AGUIAR MENDES

**INDUÇÃO DA NEURITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL (NAE) EM
CAMUNDONGOS SJL/J ATRAVÉS DE INJEÇÃO DE PROTEÍNA P2 DA
MIELINA DO NERVO PERIFÉRICO (MNP).**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade
de São Paulo- Departamento de
Neurociências e Ciências do
Comportamento para obtenção do título de
mestre em Neurociência

Área de concentração: Neurologia
Opção: Neurociência

Orientador: Prof. Dr.Amilton Antunes
Barreira

Ribeirão Preto

2012

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Mendes, Vania Alice de Aguiar

Indução da Neurite Autoimune Experimental (NAE) em camundongos SJL/J através de injeção de proteína P2 da mielina do nervo periférico (MNP). Ribeirão Preto, 2012.

71 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Neurologia.

Orientador: Antunes Barreira, Amilton.

1. Neurite autoimune experimental (NAE). 2. Camundongo SJL/J. 3. Proteína P2 da mielina do nervo periférico (MNP).

*À meus pais, Valter Gonçalves Mendes e Orlandina Portela de Aguiar
Mendes, pelo incentivo, apoio e amor incondicional. Vocês são
minha força, , minha base, meu exemplo, meu espelho e
minha saudade.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus pelas bênçãos concedidas e vitórias alcançadas. Por ser o autor e consumidor da minha fé, Pai de amor e misericordioso Senhor.

Ao Prof.Dr.Amilton Antunes Barreira pela oportunidade concedida, ensinamentos e conhecimentos transmitidos, apoio e confiança na realização desse projeto.

À minha linda família, em especial, meus amados pais, Valter Gonçalves Mendes e Orlandina Portela de Aguiar Mendes, grandes incentivadores e apoiadores nessa jornada em busca da realização e concretização de mais esse sonho. Amor eterno!

Às "milhas" do meu coração, eternas amigas que mesmo de longe estão comigo, me apoiando sempre: Valéria Santos, Ellen Costa, Verbena Roma, Livia Roma, Carolina Roma e Maura Aguiar

Aos amigos queridos Carina Spedo, Flávia Toledo, Letícia Neri, Claudia Sares, Thaisa Tognati e Giuliana Grossi que me ajudaram, escutaram e aconselharam com carinho e, que sempre tiveram uma palavra amiga e sempre torceram pelo meu sucesso.

À amiga e colega de pesquisa Milena Amorim que me acompanhou em todo o desenvolvimento árduo deste trabalho e realizou comigo parte dele.

Ao Dr. Wilson Marques e Dr. Jean Ramos pela colaboração na realização dos exames de eletroneurografia

Aos funcionários e colegas do laboratório Maria Cristina Lopes, Araçy Edwirges e Adriana Nascimento pela paciência em ensinar como conduzir os procedimentos e por terem contribuído na coleta de material para aquisição do resultado final.

Ao colega e funcionário Renato Meireles pelo profissionalismo, pela dedicação, apoio, paciência e todo suporte técnico a mim dispensados.

Ao Marquinho, como carinhosamente todos o chamam, bioterista do LNAE, por ter cuidado dos animais com muito profissionalismo e humanidade.

Ao professor Geraldo Cássio pela colaboração e contribuição na realização das análises estatísticas.

A todos, meus sinceros agradecimentos!

*“A ciência não corresponde a um mundo a descrever. Ela
corresponde a um mundo a construir.”*

Bachelard

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Nervo ciático 10º dia.....	47
FIGURA 2- Raíz e ciático 28º dia.....	48
FIGURA 3- Raíz e ciático 36º dia.....	48

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Eletroneurografia dos animais Controles - 10-30° dia cauda.....	44
TABELA 2- Eletroneurografia dos animais NAE- 10° dia cauda.....	44
TABELA 3- Eletroneurografia dos animais NAE- 30° dia cauda.....	45
TABELA 4- Eletroneurografia dos animais Controles- 10-30° dia ciático.....	45
TABELA 5- Eletroneurografia dos animais NAE- 10° dia ciático.....	46
TABELA 6- Eletroneurografia dos animais NAE- 30° dia ciático.....	46

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1- Desempenho dos animais no teste do rota-rod.....42

GRÁFICO 2- Teste de força da garra da pata anterior.....43

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice 1- Tabela de médias e desvios padrões do método de avaliação funcional rota rod nos dias analisados- grupo NAE

Apêndice 2- Tabela de médias e desvios padrões do método de avaliação funcional rota rod - grupo Controle

Apêndice 3- Tabela de médias e desvios padrões do método de avaliação funcional força de garra nos dias analisados - grupo NAE

Apêndice 4- Tabela de médias e desvios padrões do método de avaliação funcional força de garra nos dias analisados - grupo Controle

Apêndice 5- Tabela de médias e desvios padrões de avaliação de peso nos dias de maior significância estatística e gráficos dos grupos NAE e Controle

Apêndice 6- Figura da avaliação da variável peso dos grupos NAE e Controle

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFC	Adjuvante de Freud Completo
APC	Célula apresentadora de antígeno
APOE	Apolipoproteína E
BNB	Barreira sangue-nervo
β -DG	Beta-Distroglicana
DG	Distroglicana
EAE	Encefalite experimental autoimune
HE	Hematoxilina eosina
IL-12	Interleucina-12
IgG	Imunoglobulina G
IgE	Imunoglobulina E
IFN- γ	Interferon-gama
i.p.	intra-peritoneal
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
MHC II	Complexo de histocompatibilidade principal classe II
MMPs	Metaloproteinases de matriz
MNP	Mielina do Nervo Periférico

MNPB	Mielina do Nervo Periférico Bovina
MT	Micobacterium tuberculosis
NAE	Neurite Autoimune Experimental
NK	Natural killer
NO	Óxido Nítrico
PBS	Tampão fosfato salino
PAMC	Potencial de ação muscular composto
PDIA	Polineuropatia desmielinizante inflamatória aguda
p.i.	pós- imunização
SGB	Síndrome de Guillain-Barré
SJL/J	Swiss Jim Lambert/Jackson
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SCs	Células de Schwann
TP	Toxina Pertussis
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alpha

RESUMO

MENDES-AGUIAR, V.A. **Indução da Neurite autoimune experimental em camundongos SJL/J através da injeção de proteína P2 da mielina do nervo periférico (MNP)** - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

A neurite auto-imune experimental (NAE) é uma polineuropatia desmielinizante monofásica do sistema nervoso periférico (SNP). A NAE é considerada modelo experimental da síndrome de Guillain-Barré (SGB). Por se tratar de uma doença auto-imune, pode ser induzida experimentalmente em camundongos geneticamente susceptíveis, através da imunização com componentes da mielina de nervos periféricos. Para a indução da NAE podem ser utilizados P0 e P2, proteínas da mielina do nervo periférico, ou sequências conhecidas de peptídeos dessas proteínas 180-199 e 58-81 respectivamente, consideradas neuritogênicas, ou ainda transferência adotiva de linfócitos T CD4+, oriundas de camundongos previamente imunizados. Para o presente estudo foram utilizados camundongos fêmeas SJL/J não-grávidas, com idade entre 8 e 12 semanas, pesando de 17 a 20 g. Os animais foram divididos em dois grupos: um controle e outro com NAE. 200 µg da sequência de peptídeos 58-81 de P2 emulsificada em 100 µl de adjuvante de Freund completo (AFC) foram injetados por via subcutânea, em quatro locais na região lombar. Para os controles, foi utilizada solução tamponada de fosfato (PBS), emulsificada em AFC desprovida da sequência 58-81 de peptídeos P2, injetada no mesmo local, na mesma quantidade e forma. Cada camundongo tratado com P2 recebeu 200 ng de toxina pertussis em 100 µL de PBS intraperitonealmente (i.p.) nos dias 0 e 2 pós-imunização (p.i.). No grupo controle, volumes iguais de PBS e toxina pertussis foram administrados pela mesma via sem o peptídeo. Avaliações da motricidade foram realizadas diariamente até o 60º dia, além de análises funcionais e eletrofisiológicas. Foram encontradas alterações exclusivamente eletrofisiológicas, desmielinizantes e axonais, em cerca de dois terços dos camundongos. Sendo o camundongo SJL/J considerado o camundongo mais susceptível para a provocação de NAE, os achados do presente estudo indicam a limitação do modelo: ausência de alterações motoras detectáveis clinicamente, ocorrendo distúrbios eletrofisiológicos em apenas parte dos animais. O melhor modelo de NAE continua sendo o provocado no rato *Lewis* por proteína da mielina periférica bovina. É desejável que se continue buscando modelo experimental de NAE em camundongos, tendo em vista que essa espécie animal é a mais bem estudada na Biologia animal e, por essa razão, dela haver extensa variedade de imunobiológicos disponíveis para estudo da patogenia e fisiopatologia de doenças auto-imunes.

Palavras-chave: neurite autoimune experimental (NAE); camundongo SJL/J; peptídeos de P2.

ABSTRACT

Experimental autoimmune neuritis (EAN) is a monophasic demyelinating disease of the peripheral nervous system (PNS). EAN is considered to be the experimental model for Guillain-Barré syndrome (GBS). EAN can be induced in genetically susceptible mice using peripheral myelin components as immunogens: peripheral nerve myelin proteins P0 or P2; peptides sequences of those proteins considered neuritogenic, or the adoptive transfer of TCD4⁺ lymphocytes from previously immunized mice. In the present study non-pregnant female SJL/J mice aged 8-12 weeks weighing 17-20 g were used. The experimental group was treated as follows. Peptides sequence of P2 (200 µg) emulsified in complete Freund adjuvant (CFA) (100 µl) injected in four sites at the lumbar paravertebral region s.c. Controls were injected in the same sites with equal quantities of phosphate buffer solution emulsified in CFA without the peptides sequence. Each mouse treated with P2 was also treated with 200 ng pertussis toxin in 100 µL PBS i.p. at the days 0 and 2 post-immunisation. Controls were injected i.p. with equal volumes of PBS and pertussis toxin free of the peptides sequence. Motor strength, posture and coordination were evaluated daily until the 60th day post-inoculation besides electroneuromyographic (EMG) evaluation on the 10th and 30th days of some mice. No clinical disturbances were observed and in two thirds of the animals demyelinating and axonal features were detected at the EMG. SJL/J mice are considered the most susceptible mouse strain for EAN induction but the findings of the present study indicates the limitations of the model and its reproducibility. The best EAN model is yet the obtained in Lewis rat. It is important to look for a mouse model of EAN because this animal species is the most studied in the animal Biology. The extensive variety of immunobiologic products from mice allows performing studies on the pathogeny or physiopathology of autoimmune diseases more easily.

Keywords: experimental autoimmune neuritis (EAN); SJL/J mouse, P2 peptides.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	17
1.1.Nervos periféricos.....	24
1.2.Resposta imune.....	24
1.3.Fisiopatologia da NAE.....	26
1.3.1.Papel dos macrófagos e citocinas na NAE.....	26
1.3.2.Metaloproteinases de matriz (MMPs) e NAE.....	29
1.3.3.Apolipoproteína E (ApoE) e NAE.....	30
1.3.4.Papel da toxina pertussis na NAE.....	30
1.3.5.Proteína P2 da mielina do nervo periférico (MNP) na NAE...	31
1.3.6.Interleucina-12 e NAE.....	32
1.4.Aspectos clínicos e patológicos da NAE.....	33
2.OBJETIVOS.....	35
3.MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1.Animais.....	37
3.2.Antígeno.....	37
3.3.Indução da NAE.....	37
3.4.Avaliação clínica.....	38
3.5.Avaliação histológica.....	38
3.6.Avaliação funcional.....	39
3.7.Eletroneurografia do nervo periférico.....	39
3.8.Análise estatística.....	40
4.RESULTADOS.....	42
4.1.Avaliação do desempenho motor.....	42
4.1.1.Rota Rod.....	42
4.1.2.Força de Garra.....	43
4.2.Achados eletroneurográficos.....	44
4.2.1. Cauda do camundongo.....	44
4.2.2. Ciático do camundongo.....	45
4.3.Aspectos histopatológicos.....	47

5.DISSCUSSÃO.....	50
6.CONCLUSÕES.....	58
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
8.APÊNDICES	

1.INTRODUÇÃO

A neurite autoimune experimental (NAE) é uma doença desmielinizante do nervo periférico, mediada por células CD4+ T helper (Th). Os infiltrados inflamatórios são caracterizados principalmente pela presença de macrófagos e linfócitos T no espaço endoneural (ZHU, *et. al.*, 2001; MAURER, TOYKA e GOLD, 2002a, ROSTAMI, 1997 e YU *et. al.*, 2004). A NAE é considerada como um modelo experimental da síndrome de Guillain-Barré (SGB) por apresentar características clínicas e histopatológicas compatíveis com o que ocorre na síndrome no homem. A mais freqüente forma de apresentação da SGB é caracterizada, dos pontos de vista sindrômico e nosológico, como uma polineuropatia desmielinizante inflamatória aguda (PDIA) (LU & ZHU, 2011). A NAE é definida clinicamente pela participação combinada dos sistemas motor e sensorial, podendo ser caracterizada ainda pela falha na condução do nervo (CN) e subdividida de acordo com as condições clínicas e eletrofisiológicas (GARSSSEN *et. al.*, 2006). Além das características clínicas, eletrofisiológicas e morfológicas, há também características imunológicas. Por essas razões a NAE é um modelo útil para o estudo da patogenia e imunoterapia desta doença (ZHANG, WU e ZHU, 2010).

Na tentativa de indução da NAE, obteve-se sucesso, primariamente, em coelhos após injeção de mielina do nervo periférico (MNP), associada a adjuvante de Freund completo (AFC) (WASKMAN & ADAMS, 1955). Posteriormente, verificou-se a susceptibilidade de outros animais, através de imunização com MNP ou seus componentes purificados ou sintetizados, proteínas P0 e P2, associados ao AFC. Foi demonstrado que camundongo Suíço, coelho e cobaias imunizados com MNP são susceptíveis à NAE (WASKMAN & ADAMS, 1956). A linhagem de ratos *Lewis* também se mostrou susceptível (HOSFFMAN *et. al.*, 1980). Esses ratos, ao serem imunizados com peptídeos de P2 apresentam intensa desmielinização, comparável à encontrada no homem (GOLD, HARTUNG e TOYKA, 2000). A reprodutibilidade da NAE em ratos *Lewis*, em relação aos sinais clínicos exuberantes e curva evolutiva de intensidade dos referidos sinais, tem sido demonstrada ao longo do tempo. Muitos grupos de investigadores de diferentes laboratórios têm comprovado a referida

reprodutibilidade. O mesmo não tem ocorrido quando se trabalha com camundongos. No caso da NAE no camundongo C57B6+ - o mais utilizado dos camundongos em estudos experimentais com NAE -, o estudo inicial através do uso da sequência 180-199 de peptídeos da proteína P0 da mielina, associada à toxina pertussis, adjuvante incompleto de Freund (AIF) e *Mycobacterium tuberculosis* (adjuvante completo de Freund - ACF), os sinais clínicos atingiram grau de intensidade máximo de 1,5 quando foi utilizada uma escala, considerando-se 6 níveis de graduação: 0, normal; 1, flacidez da cauda, fraqueza da garra; 2, fraqueza discreta dos membros e dificuldade de se virar; 3, fraqueza grave dos membros, discreta paralisia dos membros; 4, paralisia grave dos membros; 5, paralisia completa e devastadora; 6, morte devida à NAE (ZOU *et al.*, 2000). Dos 28 camundongos machos inoculados com a referida sequência de peptídeos no referido estudo, 12 apresentaram sinais clínicos (42,8%) de NAE. Ao se adicionar *pertussis*, 15 em 16 (93,7 %) animais apresentaram os referidos sinais, com maior gravidade – apenas este grupo atingiu graduação média de 1,5 na referida escala. Estes animais começaram a apresentar distúrbios motores no 8º dia pós-imunização, o nadir foi atingido entre o 24º e o 28º dias e, com pequena flutuação, o platô alcançou o 52º dia. A ausência dos sinais motores foi observada no 56º dia neste grupo e os sinais persistiram além do 60º dia no grupo sem adição de *pertussis*. Já os animais imunizados com a sequência de peptídeos, associada a AFC, desenvolveram os primeiros sinais clínicos no 25º dia pós-inoculação e o platô foi constituído por uma curva com flutuação com o primeiro nadir tendo sido alcançado no 34º dia e o segundo com maior intensidade dos sinais, no 44º dia. A curva descendente na intensidade dos sinais se iniciou no 48º dia. O uso exclusivo de mielina bovina periférica (MBP) não se associou ao desencadeamento da doença. A investigação dos autores suecos incluiu a análise histológica, que corroborou os achados clínicos: ausência de infiltrados celulares nos nervos dos camundongos tratados com MPB, infiltrado constituído por macrófagos, linfócitos e granulócitos de pequena monta no grupo tratado com a sequência 180-199 de peptídeos da proteína P0 da mielina e de maior monta quando foi acrescida a toxina pertussis. No mesmo estudo, linfócitos foram obtidos de linfonodos dos dois grupos de animais que desenvolveram NAE, em condições assépticas, cultivados e estimulados com a referida sequência de peptídeos e

comparados entre si. A proliferação dos linfócitos estimulados foi mais rápida no grupo imunizado com a sequência de peptídeos e *pertussis* e a velocidade de proliferação foi intermediária no grupo imunizado exclusivamente com a sequência. Mesmo a proliferação na qual os linfócitos não foram estimulados, foi mais rápida no grupo com peptídeos e *pertussis*. A NAE é habitualmente obtida em 100% dos ratos *Lewis* (o que ocorre no Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental – LNAE -, no qual é desenvolvido o presente estudo), sem a necessidade do uso de toxina *pertussis*. Tanto os achados clínicos, quanto os histológicos da NAE no rato *Lewis* são mais exuberantes e obtidos de maneira mais simples quando comparados ao modelo da doença no camundongo C57B6+. Na NAE em rato *Lewis* o nadir é atingido logo depois do 10º dia de inoculação e a fase descendente, depois do platô, se inicia antes do vigésimo (ZHU *et al.*, 2011; ZHU *et al.*, 2004). Tal padrão é repetitivo neste tipo de NAE, sendo obtido também no nosso laboratório. O ciclo de doença no rato *Lewis* é, portanto, mais curto, permitindo que o tempo de observação dos experimentos com NAE também seja mais curto em ratos *Lewis* em comparação com camundongos C57B6+.

Dois estudos realizados pelo mesmo grupo de investigadores que criaram o modelo de NAE no camundongo C57B6+, no ano seguinte ao da publicação do trabalho princeps, avaliaram aspectos das respostas Th1 e Th2 na NAE do camundongo. CTLA-4 é um receptor de moléculas B7, co-estimulatórias das células apresentadoras de antígenos, que se expressa em linfócitos T citotóxicos ativados. A expressão de CTLA-4 regula para velocidade menor a proliferação de linfócitos, garantindo a homeostase da resposta imune. Essa atividade pode ser demonstrada de diferentes maneiras, por exemplo: no camundongo deficiente em CTLA-4, desenvolve-se doença linfoproliferativa, associada à ativação descontrolada de células T (WATERHOUSE *et al.*, 1995; TIVOL *et al.*, 1995). O uso de globulina de hamster anti-CTLA-4 nos camundongos C57B6+ inoculados com a sequência de peptídeos 180-199 de P0 e AFC teria evidenciado uma doença mais intensa, do ponto de vista clínico, histopatológico e da proliferação não-específica de células T nos grupos tratados com anti-CTLA-4 (ZHU *et al.*, 2001). Observamos todavia, que a intensidade dos sinais clínicos foi semelhante à que ocorre no modelo desenvolvido pelo mesmo

grupo de investigadores produzido pela seqüência de peptídeos e AFC com toxina pertussis (ZOU *et al.*, 2000). No segundo estudo foi avaliado o papel do interferon-gama (IFN- γ) no desencadeamento da NAE na mesma cepa de camundongos. Para tanto, foram utilizados camundongos mutantes C57B6+ com deficiência para o receptor de IFN γ (IFN- γ R^{-/-}). Os camundongos foram imunizados com a seqüência 180-199 de peptídeos e AFC. O grupo controle foi constituído por camundongos selvagens da mesma cepa. No grupo com deficiência do receptor, foi observada uma doença que se iniciou mais tardiamente e com intensidade das alterações menor que as do grupo controle. Uma observação que seria de bastante importância em estudos anteriores foi a de que, dentre as poucas células que infiltravam o nervo isquiático, as produtoras de IL-4 suplantavam numericamente as que secretavam IL-12 no nadir da doença. Quando foi avaliado quantitativamente o número de células secretoras de IFN- γ nos camundongos IFN- γ R^{-/-}, o seu número estava significativamente aumentado, refletindo uma falha nos circuitos imunológicos negativos de retro-alimentação. No mesmo grupo de animais foi observado que não houve alteração nos níveis de anticorpos específicos anti-peptídeos-P0. Concluiu-se que o IFN- γ contribui para a susceptibilidade da NAE no camundongo C57B6+, promovendo uma resposta imune mediada por células Th1 e suprimindo a resposta Th2. Um elegante estudo realizado pelo mesmo grupo com o mesmo modelo do anterior, utilizando camundongos *knockouts* para CD4^{-/-}, CD8^{-/-}, CD4⁻8⁻ e para células B, concluiu que: a indução e controle evolutivo são dependentes de células TCD4 e TCD8, provavelmente não tendo as células B papel na perpetuação da desmielinização associada à inflamação na NAE do camundongo C57B6+ (ZHU *et al.*, 2002).

O uso do receptor do fator de necrose tumoral exógeno do tipo I (sRTNF I) para tratamento de camundongos com NAE foi ensaiado em 2 grupos. Um dos grupos foi tratado com 3mg/Kg (200 μ g por camundongo) i.p. O tratamento se iniciou 2 dias antes da imunização e continuou em dias alternados. O outro grupo foi tratado da mesma maneira a partir do 14º dia p.i. Foi observado que o sRTNF I atenua significativamente a NAE, dos pontos de vista clínico e laboratorial. Ficou demonstrado que o uso do sRTNF I reduz significativamente o número de macrófagos, CD4+ e CD8+ em amostras histológicas do nervo ciático dos animais com NAE. Em

células esplênicas especificamente reativas ao peptídeo P0 180-199 houve uma proliferação menor *in vitro*, quando se adicionou o peptídeo, nos grupos tratados em comparação com as células do grupo não tratado. O número de células produtoras de IFN- γ , estimuladas ou não pelo peptídeo também foi menor no grupo tratado. Os níveis de TNF- α circulante, medidos em diferentes dias da evolução da NAE também foram mais baixos, quando comparados aos níveis do grupo controle. Todos os resultados foram significativos do ponto de vista estatístico, quando comparados aos do grupo controle. O estudo põe em evidência a importância do papel do TNF na NAE. A possibilidade de tratamento da SGB com sRTNF I foi considerada (BAO *et al*, 2003). O papel do TNF- α foi também estudado em camundongos deficientes em receptor I (p55) do TNF (TNFR1^{-/-}), comparando a NAE nesses animais com a NAE em camundongos selvagens, ambos induzidas por peptídeo P0 180-199. Os camundongos deficientes desenvolveram sinais clínicos mais intensos, paralelizados com o aumento do número de células inflamatórias nos nervos periféricos a maior proliferação de células T P0-reativas, bem como aumento da expressão de MHC classe II e de CCR3 em macrófagos da cauda equina. Os dados obtidos sugerem que o TNF- α poderia ter um efeito anti-inflamatório prevenindo o desenvolvimento da NAE no modelo estudado. Esse efeito aparentemente paradoxal tem diferentes explicações. Os efeitos do TNF- α podem diferir, na dependência do tempo, ou seja, uma atividade pró-inflamatória precoce pode se seguir a uma atividade imunossupressora tardia. As citocinas Th1 predominam e medeiam as respostas inflamatórias na NAE, enquanto que as Th2 têm sido associadas a atividade imunossupressora (fase de recuperação). As primeiras, juntamente com IFN- γ e a IL-12 estão ligadas à expressão da NAE. No presente estudo, ocorreu um aumento na produção de IFN- γ nas células do baço dos camundongos TNFR1^{-/-}. Há evidências de que níveis elevados na produção de IFN- γ no sangue, linfonodos e tecidos do SNP apresentam-se paralelamente à presença de sinais clínicos da NAE. Embora o estudo não tenha encontrado justificativas suficientes, indica que, apesar das suas atividades anti-inflamatórias, o TNF- α pode também ter um papel anti-inflamatório mediado através do TNFR1 (LU *et al*, 2007). Em contraposição ao papel central do TNF na indução da NAE nos camundongos C57B6+, o receptor de quimiocina CCR5 (rCC5 ou CCR5) parece não ser fundamental

para o desencadeamento da NAE. Os experimentos com camundongos C57B6+ CCR5^{-/-} não evidenciaram diferenças significativas na expressão clínica e laboratorial da NAE dos animais CCR5^{+/+}. A maior expressão dos ligantes de quimiocina MIP-1 β e IP-10 nos nervos ciáticos dos animais CCR5^{-/-} poderia compensar a ausência de CCR5, uma vez que MIP-1 β e IP-10 podem se ligar a outras quimiocinas (DUAN *et al*, 2004).

Além dos estudos sumarizados nos parágrafos anteriores, outros estudos foram desenvolvidos no sentido de elucidar mecanismos e passos imunológicos que desencadeiam a NAE para melhor compreensão da sua patogênese no camundongo C57B6+ (e seus *knockouts* (BRUNN *et al*, 2008; BRUNN *et al.*, 2010; MAO *et al*, 2010; ZHANG *et al.*, 2011). Chama a atenção, todavia, a precariedade dos sinais clínico-neurológicos e o pequeno número de grupos de pesquisa que desenvolveram esses estudos. Além disso há grupos que publicaram poucos trabalhos e não mais fizeram investigações com o modelo, não havendo muitos trabalhos que tenham reproduzido resultados similares por grupos diferentes dos que os geraram.

Diferenças na susceptibilidade à NAE existem, como descrito e comprovado: os camundongos SJL/J e Suíço são mais susceptíveis, enquanto que Balb/C, CBA e C57Bl/6 são mais resistentes (TAYLOR & HUGHES, 1985). Em camundongos SJL/J pares específicos de ligantes e receptores de quimiocina, que são uma classe de citocinas pró-inflamatórias, podem conduzir a infiltração leucocitária, devido a sua capacidade de atrair e ativar leucócitos e, por conseguinte, sua patogenicidade em NAE (XIA, YOSEF e UBOGU, 2010).

A gravidade da NAE parece relacionar-se com a dose de antígeno e o animal usado para imunização, observando-se uma correlação positiva entre ela e a intensidade dos sinais clínicos no rato (HAHN *et. al*, 1988). A NAE foi induzida em camundongos SJL/J com MNP (mielina do nervo periférico) bovina associada a AFC (ROSTAMI, 1997). Neste estudo observou-se um comprometimento do sistema nervoso periférico (SNP) menos intenso que o encontrado em ratos. Também foram estudados os sinais clínicos da NAE induzida nesses camundongos, porém imunizados com MNP bovina, AFC e toxina pertussis (TP), associados ou não a IL-12 (CALIDA *et. al*, 2000). Comparando-se com estudos prévios, foi possível observar que os sinais

clínicos foram mais intensos e de menor duração no grupo que recebeu IL-12 e, que a TP provocou o aumento da intensidade e duração desses sinais. Existem modelos de NAE que, do ponto de vista clínico, eletrofisiológico e histológico são bastante reprodutivos e comprometem os animais com mais intensidade. Todavia, a variedade de ferramentas disponíveis para estudos em camundongos é mais vasta, como, por exemplo, os testes de avaliações funcionais do SHIRPA, anticorpos e kits ELISA .

A reprodução ou obtenção de um modelo de NAE em camundongos é importante pelos seguintes aspectos:

- Trata-se da espécie animal para a qual existe maior variedade de imunobiológicos disponíveis para desenvolvimento de investigações científicas;
- Avaliações funcionais nesses animais são bem estabelecidas e muito utilizadas;
- A evolução da neuropatia periférica do ponto de vista funcional e histopatológico poderá ser reproduzida.

Tendo em vista que, considerando a literatura pertinente, o camundongo SJL/J parece ser o mais susceptível à NAE e com vistas a estudos relativos à patogênese da doença e seu tratamento, elaborou-se o presente estudo.

1.1.Nervos periféricos

O desenvolvimento dos nervos periféricos envolve um processo de interação simbiótica e dinâmica, entre axônios e células de Schwann (JESSEN & MIRSKY, 1994). Dentre os vários tipos celulares, as células de Schwann são as principais constituintes do SNP. Elas são confinadas ao SNP e, em situações normais, raramente são vistas no SNC. As células de Schwann migram da crista neural e assumem a função de mielinizar ou envolver os axônios do SNP. São células extremamente lábeis e exercem um papel crucial na formação dos nervos e, ainda auxiliando os SNC e SNP nos processos regenerativos (JESSEN & MIRSKY, 1997).

Em roedores, nos primeiros dias de vida, as células de Schwann divergem em função: as mielinizantes envolvem os axônios de maior diâmetro, as não mielinizantes acomodam-se superficialmente sobre os axônios de menor diâmetro formando uma membrana celular (MIRSKY *et. al.*, 2001). Em determinadas condições

as células de Schwann (SCs) podem funcionar como células apresentadoras de antígenos facultativos,. Um reforço na função de SCs apresentadoras de antígenos foi encontrado em camundongos apoE-deficientes para peptídeo P0 180-199 de células T específicas (ZHANG, WU e ZHU, 2010). Elas participam ativamente na resposta imune local como fonte de citocinas no SNP (KOSKI, 1997). Em estudos anteriores, descobriu-se que a capacidade das SCs como apresentadoras de antígeno em camundongos apoE-deficientes está relacionada à maior produção de IL-6 (DUAN *et. al.*, 2007).

1.2.Resposta imune

O estudo dos mecanismos imunológicos que corroboram para a resolução da doença é extremamente relevante, uma vez que esse modelo simula um surto da doença humana.

O sistema imune ou sistema imunológico, tem como função produzir uma resposta, com a finalidade de defender nosso organismo, contra agentes invasores (antígenos), como vírus, bactérias, fungos, protozoários ou parasitas multicelulares e corpos estranhos, que podem causar doenças e levar o hospedeiro a óbito se sua multiplicação ocorrer de forma descontrolada. Uma resposta imunológica pode envolver o reconhecimento do antígeno ou padrões moleculares dos agentes infecciosos, e posteriormente, a elaboração de uma nova reação dirigida a esses elementos, com a finalidade de eliminá-los do organismo (LIPPOLIS, 2008). A interação do sistema imune humoral e celular com os componentes estruturais do sistema nervoso periférico pode determinar a extensão da inflamação e possivelmente reparar mecanismos (MAURER, TOYKA e GOLD, 2002b).

O sistema nervoso periférico (SNP) é alvo de um ataque heterogêneo imunomediado por células T, células B e macrófagos (MAURER, TOYKA e GOLD, 2002b). E o sistema imune possui um extenso repertório de receptores para antígeno, expressos tanto em linfócitos T como linfócitos B, essa característica atribui ao sistema imune a habilidade de reconhecer grande quantidade de agentes invasores (ZHANG, WU e ZHU, 2010). Os diferentes tipos de resposta imunológica enquadram-

se em duas categorias: resposta imune inata (ou não-adaptativa) e resposta imune adaptativa ou adquirida. Daquela, participam células com capacidade fagocítica, como monócitos, macrófagos e neutrófilos. Estas células reconhecem, fagocitam e destroem um antígeno, constituindo, desse modo, a primeira linha de defesa humana contra a invasão de corpos estranhos (HELM, 2004). A ativação do sistema imune inato é essencial na resposta à infecções, participando da eliminação do agente infeccioso, da ativação da resposta imune adaptativa e do remodelamento tecidual. A resposta imune/inflamatória disparada por moléculas de patógenos é amplificada por mediadores endógenos, como as citocinas (NATHAN, 2002). A resposta imune adaptativa tem como característica principal o reconhecimento específico de um antígeno, tendo os linfócitos como células centrais. Dentre elas, destacam-se os linfócitos T- auxiliares. Estas, após reconhecerem um antígeno previamente fagocitado pelas células da resposta imune inata, por meio do processo de apresentação de antígenos, produzem citocinas que, por sua vez, promovem a ativação de outros componentes do sistema imunológico e outro subgrupo de linfócitos, os linfócitos B, que, por conseguinte, se encarregam de produzir anticorpos específicos para aquele antígeno e, ainda com função regulatória. Quando a resposta for Th1 haverá a ativação de macrófagos por parte das células T CD4⁺ (JANEWAY & MEDZHITOV 2002) . No decorrer deste processo, são formadas células de memória, que respondem de forma mais rápida e eficiente a uma reinfecção (CASSIS, AIELLO e NORIS, 2005).

As células B têm a capacidade de reconhecer uma variedade de antígenos, desde peptídeos, proteínas, ácidos nucleicos, lipídeos, polissacarídeos a pequenos produtos químicos, em contrapartida, as células T reconhecem apenas peptídeos dispostos em uma seqüência primária de aminoácidos associados à molécula de MHC (HARTUNG & TOYKA, 1996). Além disso, o reconhecimento do antígeno pelas células T CD4⁺ ou *helper* ou pelas T CD8⁺ ou *citotóxicas* se dá apenas quando o mesmo está ligado a uma molécula do complexo MHC do próprio indivíduo, manifesta na superfície da célula apresentadora de antígeno (APC) (ZHU *et. al.*, 1994). As APCs (macrófagos, células dendríticas ou linfócitos B) transformam antígenos protéicos em peptídeos, unindo-os às moléculas do MHC. O complexo formado migra para a superfície da célula onde possivelmente será reconhecido por linfócitos T CD4⁺

ou T CD8⁺, de acordo com o MHC classe I ou II no qual o peptídeo encontra-se acoplado, este é considerado o sinal inicial sendo, portanto, imprescindível para a ativação dos linfócitos T. O sinal seguinte, é dado pela ligação de moléculas co-estimulatórias encontradas tanto nos linfócitos, como nas APCs. E a inibição da expressão de algumas de suas moléculas suprime a resposta dos linfócitos T e por conseguinte o processo inflamatório (LENSCHOW, WALUNAS e BLUESTONE, 1996; DERETZI *et.al*, 1999).

1.3.Fisiopatologia da NAE

NAE em animais e SGB em humanos apresentam uma imunopatogênese comum (WILLIAM & PETER, 1973).

Acredita-se que sua patogênese envolva infiltração linfocítica, tanto nos nervos periféricos, quanto em suas raízes, causando um processo de desmielinização neural acompanhado ou não de degeneração axonal. Provavelmente, todas essas alterações estão relacionadas a processos imunomediados (SPAANS *et. al*, 2003).

Linfócitos T auto-reativos estimulam as células B a produzirem anticorpos, que por sua vez podem bloquear a condução nervosa, ativar o complemento, e facilitar um ataque de macrófagos no nervo periférico. Essas células T ativadas transgridem a barreira hemato-nervosa e provocam inflamação local por citocinas pró-inflamatórias, dando origem a fase efetora da resposta imune na NAE (ZHANG, WU e ZHU, 2010 e HORSTE *et. al*, 2008).

1.3.1.Papel dos macrófagos e citocinas na NAE

Os macrófagos são as principais células apresentadoras de antígenos e células efetoras na patogênese da NAE. Seu papel fundamental em dano do nervo imunomediado é ataque direto fagocitário à mielina, e a liberação de citocinas pró-inflamatórias e outras moléculas nocivas (ZHANG, WU e ZHU, 2010). É provável que macrófagos residentes no endoneuro atuem como células apresentadoras de antígenos locais por sua capacidade de expressar antígenos do complexo principal de

histocompatibilidade (MHC). Destacam-se também como importantes mediadores tóxicos, e causam dano direto aos axônios e células de schwann mielinizadas Os macrófagos hematogênicos infiltrados encontram seu caminho para o nervo periférico, juntamente com as células T pela ação de moléculas de adesão, metaloproteinases de matriz e os sinais quimiotáticos (HORSTE *et. al*, 2008)..

A NAE é mediada por células T CD4⁺ que podem ser induzidas por macrófagos associados a desmielinização (LU & ZHU, 2011). Macrófagos são importantes células efetoras, porém, também desempenham um papel fundamental na indução e aumento da resposta imune (ZIELASEK *et. al.*, 1995). Dentro do nervo, os macrófagos regulam a inflamação através da secreção de várias citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-17, IL-18, IL-23, IFN- γ , TNF- α e quimiocinas que, contribuem significativamente para o desenvolvimento da doença através do recrutamento de células efetoras do SNP, permitindo a liberação, in situ, de outros produtos tóxicos para as células de Schwann (SCs) e mielina tais como, radicais livres, intermediários de oxigênio e óxido nítrico (NO) (KIEFER *et. al.*, 2001, LIPPOLIS, 2008; LU & ZHU, 2011). A imunização com componentes da mielina derivados das células de schwann como fonte celular pode ser usada para induzir uma resposta imune contra o SNP (HORSTE *et.al*, 2008). Durante a fase de recuperação, os macrófagos estão firmemente envolvidos na proliferação de células de Schwann, permitindo remielinização, e regeneração axonal para prosseguir. Portanto, é possível afirmar que desempenham um papel duplo na neuropatia auto-imune (KIEFER *et. al.*, 2001).

As células T CD4⁺ podem se diferenciar em subpopulações celulares do tipo Th1 ou Th2 de acordo com o micro-ambiente. Em NAE, essas células Th1 predominam e medeiam respostas inflamatórias, pois secretam citocinas como IL-2, IFN- γ e TNF- α que irão mediar as reações de hipersensibilidade tardia e induzir a síntese preferencial de alguns isotipos de imunoglobulinas. Já os linfócitos T CD4⁺ do tipo Th2 estão associadas com a recuperação da doença, pois secretam citocinas como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 e estão relacionadas com a produção de imunoglobulinas dos tipos Ig1 e IgE (ZHANG, WU e ZHU, 2010; NICHOLSON & KUCHROO, 1996).

Foi descoberto, mais recentemente que, os linfócitos Th17, secretores de IL-17, estão envolvidos na defesa contra micro-organismos e na mediação de inflamação, portanto também tem importante papel nas doenças autoimunes. (LU & ZHU, 2011).

Múltiplos fatores, tais como, o tipo de APC, a dose do antígeno, a presença de moléculas co-estimulatórias e as citocinas presentes no microambiente podem influenciar na diferenciação dos subtipos Th1 ou Th2. A IL-12 e o IFN- γ quando presentes no microambiente onde a resposta imune acontece ocorre uma diferenciação para o subtipo Th1, enquanto que, a IL-4, por exemplo, é fundamental para a diferenciação do subtipo Th2 (ROMAGNANI, 2006). Estudos mostram que a TNF- α , IFN- γ , e IL-1 β , quando associados, podem desencadear a NAE (ZHU, MIX e LINK, 1998). TNF- α é produzido por muitas células, incluindo macrófagos, células T e SCs. E em resposta imune, esta citocina quando induzida por metaloproteinase de matriz (MMP-9) promove o recrutamento de macrófagos em nervos periféricos lesionados (LU & ZHU, 2011). IFN- γ é o principal marcador de resposta TH1, produzido pelas células T e NK (Natural Killers), seus efeitos são induzidos e regulados por IL-12. Suas funções incluem a ativação de macrófagos, diferenciação de células T, indução de expressão MHC I e MHC II, comutação de classe de células B, apoptose das células T e outros tipos de células, aumento da produção de outras citocinas tais como TNF- α , IL-1 β , IL-6, aumento da regulação das metaloproteinases, quimiocinas e moléculas de adesão. IFN- γ também auto-regula citocinas induzidas por síntese de NO específico (iNOS) (CANTHABOO *et. al.*, 2002). Uma forma de citocina capaz de induzir óxido nítrico sintase (NOS) está presente em macrófagos de roedores (XIE, *et. al.*, 1992). Entende-se que o NO contribui para a fisiopatologia de doenças inflamatórias (BOGDAN, ROLLINGHOFF e DIEFENBACH, 2000). Todavia, pode ser expresso em vários tipos celulares em resposta aos lipopolissacarídeos, citocinas ou outros agentes, isto é, a presença de níveis excessivos de citocinas, por exemplo, como parte do processo inflamatório, estimula a produção de NO nos tecidos, podendo, por conseguinte, levar a sua destruição. (FORSTERMANN & SESSA, 2011). Na inflamação, o NO é produzido em grandes quantidades através da NOS (óxido nítrico sintases) tipo II, demonstrando sua importância como mediador

inflamatório. Uma produção diminuída ou uma inativação acelerada de NO e/ou uma disponibilidade reduzida do seu precursor, a L-arginina, associam-se à patogênese de várias doenças, inclusive a NAE (MONCADA & HIGGS, 2006)

1.3.2. Metaloproteinases de matriz (MMPs) e NAE

As Metaloproteinases da Matriz (MMPs) formam o maior grupo de enzimas que regula a composição da matriz extracelular. Utilizam o zinco para as suas atividades proteolíticas. Portanto, desempenham um papel vital na resposta imune normal, bem como em várias condições patológicas (NYATI *et. al.*, 2010).

Sobre-expressão de MMPs e degradação de β -DG (beta-distroglicana) estão associadas a NAE. Nos nervos periféricos, a DG é produzida por células de Schwann e localizada na membrana externa justaposta à lâmina basal. Portanto, clivagem ou quebra de β -DG pode resultar em desmielinização do nervo e infiltrado inflamatório, pois o complexo DG estabiliza a membrana plasmática, agindo como um eixo de ligação da matriz extracelular do citoesqueleto intracelular, e desempenha um papel único na formação de mielina e na estabilidade (ZHAO *et. al.*, 2010).

Aumento da regulação do MMP-9, juntamente com citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e IL-1 β , no curso precoce parece estar associado com progressão das doenças imunomediadas, resultantes de inflamação do sistema nervoso periférico, considerando que, essa regulação está implicada em recuperação da doença durante a fase tardia (NYATI *et. al.*, 2010).

Comprova-se a participação da metaloproteinase-9 (MMP- 9) em uma variedade de doenças auto-imunes, desempenhando um papel primário ou secundário em cada uma destas doenças por alta ou baixa regulação. Sua expressão não é constante e depende da indução ou supressão realizada por muitas moléculas reguladoras (RAM, SHERER e SHOENFELD, 2006).

A expressão de MMPs sugere que estas enzimas podem desempenhar um papel crucial, ainda multifatorial no processo que conduz à ruptura da barreira hemato-nervosa. MMPs podem, portanto, servir como um alvo potencial para novas terapias imunomoduladoras (MAURER, TOYKA e GOLD, 2002b)

1.3.3. Apolipoproteína E (ApoE) e NAE

Apolipoproteína E (apoE) é uma proteína glicosilada de 34,2 kDa com 299 resíduos de aminoácidos. Existem três isoformas em seres humanos (apoE2, apoE3 e apoE4, codificados pelos alelos APOE ϵ 2, ϵ 3, ϵ 4, respectivamente), que diferem em resíduos de aminoácidos nas posições 112 e 158 (RALL, WEISGRABER e MAHLEY, 1982). ApoE é sintetizada principalmente no fígado, mas também pelas células do baço, cérebro, pulmão, rim, ovário, adrenal, e tecidos musculares. No sistema nervoso, apoE mRNA está presente em neurônios, astrócitos, células endoteliais e células de Schwann não mielinizadas (ZHANG, WU e ZHU, 2010). Além de suas múltiplas funções, destaca-se a neurodegeneração (KIM, BASAK e HOLTZMAN, 2009). ApoE pode modular respostas imunes em NAE através de alterações nas funções dos macrófagos, células T e barreira sangue-nervo (BNB), deslocando o equilíbrio Th1/Th2 (YU *et al.*, 2004). Suas propriedades incluem ainda a supressão da estimulação de neutrófilos cultivados, a facilitação do antígeno lipídico representado pelas moléculas CD1 a células T natural killer (NKT), e modulação da inflamação e oxidação. Estas fortes evidências apoiam também seu papel crucial na regeneração e remielinização do nervo periférico (ZHANG, WU e ZHU, 2010).

1.3.4. Papel da Toxina Pertussis na NAE

A bactéria *Bordetella pertussis* é um bacilo gram-negativo. Dentre as toxinas produzidas por essa bactéria, destaca-se a pertussis, relacionada tanto com a patogênese da infecção quanto com a proteção imune (SMITH, GUZMÁN e WALKER, 2001).

Toxina Pertussis (TP) é uma exotoxina conhecida por aumentar a resposta inflamatória que envolve a histamina e a serotonina, incluindo reações mediadas por células de hipersensibilidade tardia (YONG, MEININGER e LINTHINCUM, 1993). Numerosas doenças auto-imunes murino- órgão-específicas exigem a utilização da TP para intensificá-la (MUNOZ *et al.*, 1981 e RYAN *et al.*, 1998). Essa substância pode potencializar a proliferação das células T e, a secreção de IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-5 quando injetados com outros antígenos (RYAN *et al.*, 1998). A adição de toxina

pertussis, isoladamente ou em combinação com outras substâncias, é indispensável para a valorização da doença clínica (CALIDA *et. al*, 2000).

1.3.5. Proteína P2 da mielina do nervo periférico (MNP) na NAE

Entre outros antígenos, a mielina periférica é composta por duas proteínas básicas denominadas P0 e P2. Ambas são bem conservadas, apresentando homologia entre humanos e bovinos. A fração P2 um composto imunogênico da mielina periférica foi descrita como indutora de neurite periférica e posteriormente, seus epítomos com efeito neuritogênico foram identificados (WHITAKER, 1982). Por constituir até 18% do total de proteína da mielina do sistema nervoso periférico (SNP), é considerada um componente importante do mesmo e, seus fragmentos são conhecidos por causarem desmielinização na NAE (BROSTOFF *et. al.*, 1972; MAJAVA *et. al.*, 2010).

Alguns estudos mostram que o uso, em ratos, de doses (100 µg) de P2 pode provocar uma NAE aguda com a média de duração menor que 30 dias (ROSTAMI & GREGORIAN, 1991), enquanto que doses mais altas (230µg a 240µg) induzem a doença de forma crônica e severa, isto é, em torno de 118 dias em média de duração (DERETZI *et. al*, 1999). P2 é considerada o principal antígeno neuritogênico em estudos de NAE com ratos *Lewis* e camundongos SJL/J (ROSTAMI, 1990). É possível ainda provocar um aumento acentuado na apoptose de células T no nervo ciático dos ratos *Lewis* (MAURER, TOYKA e GOLD, 2002b).

1.3.6. Interleucina-12 e NAE

A IL-12 é um complexo heterodímero p70 composto pelas subunidades p40 e p35 ligadas por pontes de sulfeto. Mais recentemente verificou-se que homodímero IL-12p40 suprime células T reguladoras via NO (LU & ZHU, 2011). A interleucina-12 (IL-12) é o principal mediador da resposta imune inata inicial a microorganismos intracelulares e é indutora essencial da imunidade mediada por células. Foi identificada originalmente como ativadora da função citolítica das células Natural Killers (NK) (KOBAYASHI *et. al.*, 1989; STERN *et. al.*, 1990). Ela é secretada pelas células dendríticas, linfócitos B e pelos macrófagos. Sua função primordial é estimular a produção ou aumentar a secreção de IFN- γ pelas células NK e pelos linfócitos T auxiliares (CD4+ e CD8+) (SZABO *et al.*, 2003). Através destas células auxiliares a IL-12 medeia efeitos biológicos como a indução da produção de citocinas (IFN- γ , TNF- α , IL-2 e outras) e podendo ainda induzir as células B a se proliferarem (SUN *et. al.*, 2007). Embora a IL-12 possa ser induzida tanto in vivo como in vitro a partir de estimuladores potentes na ausência de IFN- γ , o feedback positivo dado pela mesma é um requisito para a indução de IL-12 (TRINCHIERI, 1995). É considerada a principal citocina para indução de resposta Th1, podendo intensificar uma doença mediada por ela, tal como a NAE. Esta interleucina é também conhecida por ser uma citocina pró-inflamatória com importantes atividades imunomoduladoras, suas mutações produzem variantes que induzem a infecção por micobactérias (HARTUNG *et. al.*, 1990; BAO *et. al.*, 2002).

Estudos realizados comprovaram que o tratamento adicional de NAE com IL-12 murina recombinante (mrIL-12) em camundongos prolongou o curso da doença caracterizada por início precoce e fase de recuperação tardia, indicando assim, seu papel fundamental no início e perpetuação dos eventos patogênicos da mesma (LU & ZHU, 2011).

1.4.Aspectos clínicos e patológicos da NAE

A NAE desenvolvida em rato Lewis apresenta-se por volta do 15º dia, após imunização com peptídeo neuritogênico, atingindo seu grau máximo em média até o 17º dia e, recuperam-se gradual e completamente até o 46º dia p.i (DIEPERINK *et. al.*, 1991).

No modelo da Encefalomielite experimental auto-imune (EAE), que é uma doença desmielinizante do Sistema Nervoso Central, considerada como modelo animal da esclerose múltipla e ainda reconhecida como uma doença análoga a NAE, o período de recuperação e seus mecanismos estão sendo explorados (BROSTOFF *et. al.*, 1972; ZHU *et. al.*,1994 e HORSTE *et. al.*, 2011). Estudos relatam que a apoptose de linfócitos T encefalitogênicos na EAE e neuritogênicos na NAE poderia explicar a fase de recuperação da doença (SWANBORG, 2001).

De acordo com investigação realizada (XIA, YOSEF e UBOGU, 2010) nos camundongos fêmeas Swiss Jim Lambert/Jackson (SJL/J), os primeiros sinais de NAE apareceram no 9º dia p.i. quando utilizado o combinado de BPNM+CFA+ TP + mrIL-12. E, utilizando-se o mesmo protocolo (CALIDA *et. al.*, 2000) os sinais foram observados a partir do 12º dia p.i. O pico de gravidade se deu entre 26-32 dias p.i e a fase final de recuperação aconteceu entre 55-63 dias p.i. (XIA, YOSEF e UBOGU, 2009)

Estudos tentando estabelecer NAE em camundongos de diferentes linhagens foram bem menos sucedidos, pois os sinais variam de leves a moderados (TAYLOR & HUGHES, 1985; HORSTE *et. al.*, 2008). Desta forma, é nossa intenção nesse estudo reproduzir o modelo da NAE em camundongos SJL/J imunizados com peptídeos da proteína P2 para demonstrar que é adequada para indução e evolução da doença.

2.OBJETIVO

2.OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi investigar o desenvolvimento e evolução da NAE em camundongos SJL/J, caracterizando seus sinais clínicos, funcionais, histológicos e eletroneuromiográficos.

3.MATERIAL E MÉTODOS

3.MATERIAL E MÉTODOS

3.1.Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas SJL/J (Swiss Jim Lambert/Jackson) não-grávidas, com idade entre 8 e 12 semanas, pesando de 17 a 20g, divididos em dois grupos:

- Controle- n=4
- Experimental NAE- n=25

Os animais foram adquiridos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Unicamp. Foram transferidos para o Biotério do Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (LNAE). Os mesmos foram mantidos em ambiente com ciclo de luminosidade de 12 horas por dia, temperatura de 20° a 24° C e receberam dieta padrão do biotério e água "*ad libitum*".

O protocolo experimental foi aprovado em 31/05/2010 pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Protocolo n. 049).

3.2.Antígeno

Proteína P2 da mielina do nervo periférico bovina na sequência 58-81 TESPfKNTEISFKLGQEFETTADNR, inicialmente sintetizada em laboratório pela Genemed Synthesis Inc. (San Francisco, CA, USA).

3.3.Indução da NAE

Os animais foram anestesiados com 100 mg / kg ketamine/10 mg / kg de xilazina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, E.U.A.) antes da indução da doença. 200 µg de peptídeo da proteína P2 emulsificado em 100 µl de adjuvante completo de Freund

(AFC) foi injetado por via subcutânea, com um seringa de tuberculina em volumes iguais (50 µL) em quatro locais na região paravertebral, bilateralmente na região lombar. Cada camundongo com NAE recebeu 200 ng de toxina Pertussis (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, E.U.A.) em 100 µL de PBS 1X intraperitonealmente (i.p.) nos dias 0 e 2 pós-imunização (PI). Os controles foram submetidos ao mesmo procedimento, injetados com PBS 1X emulsionado em AFC desprovido de peptídeo, assim como também receberam injeções de toxina pertussis, da mesma forma descrita acima sem peptídeo P2.

3.4.Avaliação clínica

A partir do dia anterior a imunização (-1) os animais foram pesados e avaliados diariamente até o 60º dia p.i. A avaliação clínica foi baseada na classificação descrita a seguir: 0- Normal, 1- Menos atividade, 2-Dificuldade em manter-se ereto / hipotonia dos músculos da cauda, 3- Impossibilidade de manter-se ereto, 4- Marcha atáxica, 5- Paralisia leve das patas posteriores, 6- Paralisia moderada das patas posteriores, 7- Paralisia grave das patas posteriores, 8- Tetraparesia, 9- Aspecto moribundo e 10- Morto (KING *et al.*, 1983).

3.5.Avaliação histológica

Fragmentos das raízes do nervo ciático e o próprio, próximo a trifurcação na altura da fossa poplítea, foram retirados após anestesia (Ketamina/ Xilazina) e perfusão intracardiaca com glutaraldeído 2,5%, colocados em filtro de papel para manter o alinhamento e novamente embebidos em glutaraldeído 2,5% além de tampão cacodilato 0,1 M e imediatamente armazenadas a 4 ° C. Os fragmentos foram incluídos em parafina e corados com H & E.

3.6.Avaliação funcional

Os animais foram avaliados através do protocolo de avaliação neurológica SHIRPA (SmithKline/Harwell/Imperial College/RoyalHospital/Phenotype Assessment) simplificado (ROGERS *et. al*, 1997; HATCHER *et. al*, 2001). Trata-se de um conjunto de testes funcionais capazes de detectar alterações na resposta motora (força e motricidade) e nas sensibilidades térmica e dolorosa através da quantificação da classificação funcional atribuída ao animal em determinado momento (KULESSKAYA, RAUVALA e VOIKAR, 2011). Esse conjunto de testes consiste em observações quantitativas e semi-quantitativas de reflexos e funções sensório-motoras básicas (LALONDE *et. al*, 2005). Dentre eles foram utilizados os testes de Rota Rod (RR) e Grip Strenght (força de garra) realizados antes da imunização e ao longo da evolução da doença antecedendo os sacrifícios nas datas previamente determinadas. O RR avalia a coordenação, equilíbrio e aprendizagem motora. Os camundongos foram submetidos a três sessões de habituação e três ensaios gravados por dia de teste com intervalos para descanso entre os mesmos. A velocidade de aceleração foi de 4-40 r.p.m. num período de 5 min. A melhora nos ensaios corresponde à medida de aprendizagem motora (KULESSKAYA, RAUVALA e VOIKAR, 2011). O teste de força de garra, utilizado para verificação das funções espinocerebelares, avalia tônus do corpo e das patas. Os animais são avaliados quanto a força de preensão quando arrastados pela cauda sobre uma barra horizontal ou grade. E estas avaliações são complementadas, entre outras, por eletroneuromiografia e peso corporal que, neste trabalho também foram estudados (ROGERS *et. al*, 1997; LALONDE *et. al*, 2005; JACQUELIN, STRAZIELLE e LALONDE, 2012).

3.7.Eletroneurografia do nervo periférico

Estudos eletroneurográficos foram realizados nos dias 10 e 30 p.i. e comparados entre os grupos. O nervo caudal e os nervo ciático de um lado foram estudados. Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de 100 mg / kg ketamine/10 mg / kg xilazina (Sigma-Aldrich) e suas extremidades inferiores e tronco

distal foram raspados com um barbeador elétrico. Uma dose adicional de 100 mg / kg de ketamina foi dada quando os camundongos despertaram durante o estudo. Os mesmos foram colocados em decúbito ventral em uma plataforma de isopor e confortavelmente contidos com as patas estendidas. As áreas com granulomas da pele secundárias a injeção de AFC locais foram evitadas. Posteriormente à eletrofisiologia do nervo, alguns dos animais sofreram eutanásia através de injeção intraperitoneal de 100 mg / kg de Ketamine/10 mg/kg de xilazina (Sigma - Aldrich, St. Louis, MO) em PBS 1x. Foi utilizado um sistema eletrodiagnóstico portátil Meditronic Functional Diagnostics Keypoint Vs. 3,01 com monitor na marca LG tipo LCD Flatron de 19 polegadas. Um filtro foi definido em 20 Hz e o outro, fixado em 10 kHz. Para o estudo da condução nervosa do nervo caudal motor foi utilizada agulha subdérmica, como eletrodo ativo e de referência, colocados sobre a base da cauda (eletrodo ativo), e o eletrodo de referência cerca de 10 mm distalmente. A estimulação monopolar com agulha subdérmica (catodo) foi feita cerca de 5 mm de distância lateral ao sacro para a resposta distal. Para resposta proximal, o estímulo foi dado através do eletrodo colocado cerca de 8 a 12 milímetros proximalmente lateral à vértebra lombar. O ânodo foi fixado por via subcutânea, sobre o sacro. O estudo da condução do nervo ciático motor foi realizado pela estimulação do mesmo na coxa distal e ao redor do entalhe sacral (região glútea), com captação no músculo gastrocnêmio. A amplitude do potencial de ação muscular composto (PAMC), duração do PAMC distal (medida a partir do início da formação inicial negativa ao regresso definitivo de volta à linha de base) e da velocidade de condução foram determinados para cada nervo estudado.

3.8. Análise estatística

Para comparar valores entre os grupos utilizamos o teste de Mann-Whitney não pareado em virtude dos tamanhos amostrais. Para verificação de tendências ao longo do tempo utilizamos o método de análise de regressão linear. E foi adotado como nível de significância $P \leq 0,05$.

4.RESULTADOS

4.RESULTADOS

4.1.Avaliação do desempenho motor

4.1.1.Rota Rod

Gráfico 1: **Desempenho dos animais no teste do rota-rod.** Não houve diferença significativa no desempenho motor dos animais no 20º e 30º dias, em comparação com os controles ($p = 0,9$ e $=0,6$ respectivamente).

A regressão linear realizada com os dados do grupo NAE não evidenciou alteração significativa no desempenho motor no teste do rota-rod ao longo do tempo de observação.

A observação visual da marcha na caixa com fundo graduado no mesmo período não evidenciou qualquer distúrbio motor.

4.1.2. Força de Garra (Grip Strenght)

Gráfico 2: Teste de Força da garra da pata anterior. A comparação da variável força de garra foi realizada nos dias 17 e 30 entre os grupos NAE e controle. Não evidenciou diferença significativa (no 17º dia $p=0,77$ e no 30º $=0,15$).

Na análise através de regressão linear com os dados do grupo NAE não houve tendência nem para aumento nem para diminuição ao longo dos dias com $p=0,17$.

4.2. Achados eletroneuromiográficos

4.2.1 Cauda do camundongo

Tabela 1 –Eletroneurografia dos animais controles (10°- 30°dia)

Animal	Latência Distal (ms)	VC (m/s)	Amplitude (mV)		Duração (ms)	
			Distal	Prox	Distal	Prox
Cx1RA6 (Cx4PA6)	0,71	75	11,1	7,6	1	1
Cx3VA5 (Cx4PA5)	0,71	66,7	18,5	13,8	1	1,1
Cx3VA1	0,67	56,3	20,5	19,6	1,3	1,1
Cx3VA2	0,88	75	18,6	17,7	1,3	1,2

Legenda: Prox= proximal; ms= milissegundos; m/s= metros por segundo; mV= milivolts

Tabela 2 – Eletroneurografia – Neurite alérgica experimental - Cauda (10° dia)

Animal	Latência Distal (ms)	VC (m/s)	Amplitude (mV)		Duração (ms)	
			Distal	Prox	Distal	Prox
Cx1A1	1,08	35,3	3,8	3,6	1,1	1
Cx1A2	0,93	29,4	8	7,5	1	1
Cx1A3	0,89	31	6,3	4,7	0,9	0,8
Cx1RA1	0,77	56,3	14	14	1,4	1,4
Cx1RA2	0,83	69,2	18	14,6	1,3	1,3
Cx1RA3	0,92	66,7	9	7,5	1,3	1,1
Cx1RA5	0,71	75	18,1	15,6	1,5	1,4
Cx2VA2	0,72	69,2	10,2	9,1	1,7	1,7
Cx2VA3	0,75	87,5	20,3	17,1	1,5	1,3
Cx2VA4	0,71	66,7	14,6	14,6	1,4	1,3
Cx1A2	0,75	34,5	4,2	2,5	0,7	0,8
Cx1A3	1	32,6	4,2	4,1	0,8	0,8
Cx1A4	0,71	37,9	7	6,6	1,1	0,9

Legenda: Prox= proximal; ms= milissegundos; m/s= metros por segundo; mV= milivolts.

No 10° dia: 6 animais apresentavam significativa redução da velocidade de condução dos potenciais de ação muscular compostos (PAMC) com redução associada das respectivas amplitudes. (Tabela 2).

Tabela 3- Eletroneurografia- Grupo NAE- Cauda- 30° dia

Animal	Latência Distal (ms)	VC (m/s)	Amplitude (mV)		Duração (ms)	
			Distal	Prox	Distal	Prox
Cx1A4	0,88	14	7,2	7,1	1	1
Cx1A5	0,93	16,4	5	4,1	0,8	0,9
Cx2A2	1,25	76,9	3,6	2,1	1,2	1,4
Cx1RA3	0,71	75	18,9	17,4	1,4	1,4
Cx1RA5	0,71	66,7	12,5	11,7	1,2	1,1
Cx2VA3	0,75	69,2	17,1	15,8	1,3	1,1

Legenda: prox=proximal; ms= milissegundos; m/s= metros por segundo; mV= milivolts.

No 30° dia: 2 animais tiveram diminuição significativa da velocidade de condução com redução associada das amplitudes; outro animal apresentou latência distal prolongada e amplitude reduzida, com preservação da velocidade de condução. Constatou-se, portanto, que 3 dos 6 animais tinham alguma anormalidade no estudo da condução. Dentre esses, um (Cx1A4) já apresentava alterações no estudo realizado no 10° dia, com piora da velocidade de condução no 30° dia (Tabela 3).

4.2.2. Ciático de camundongo

Tabela 4- Eletroneurografia- Grupo Controle- Ciático 10° ao 30° dia

Animal	Latência Distal (ms)	VC (m/s)	Amplitude (mV)		Duração (ms)	
			Distal	Prox	Distal	Prox
Cx1RA6 (Cx4PA6)	0,83	70,6	39	38,8	1,1	1
Cx3VA5(Cx4PA5)	0,83	76,9	44	43,2	1	1
Cx3VA1	0,65	68,5	27,4	26,7	1,4	1,4
Cx3VA2	0,75	69,2	31,1	28,7	1,3	1,3

Legenda: Prox=proximal; ms= milissegundos; m/s= metros por segundo; mV= milivolts

Tabela 5- Eletroneurografia- Ciático - Grupo NAE 10º dia

Animal	Latência	VC (m/s)	Amplitude (mV)		Duração (ms)	
	Distal (ms)		Distal	Prox	Distal	Prox
Cx1A1	0,92	38,6	16,6	11,3	0,8	1
Cx1A2	0,88	39,2	10,9	9,1	0,7	0,8
Cx1A3	0,88	30,4	8,7	6,7	0,8	0,9
Cx1RA1	0,68	61,5	41,8	41,3	1,2	1,2
Cx1RA2	0,67	56,3	38,2	36,6	1,3	1,3
Cx1RA3	0,78	65	36,6	32,7	1,3	1,3
Cx1RA5	0,83	61,5	44,5	43,5	1,2	1,1
Cx2VA2	0,71	75	30,2	28,4	1,9	1,8
Cx2VA3	0,75	61,5	39	38,2	1,7	1,7
Cx2VA4	0,71	64,7	31,8	29,1	1,5	1,1
Cx1A2a	0,88	34,9	2,2	1,9	0,9	0,8
Cx1A3a	1	48,3	3,1	1,2	0,8	1

Legenda: Prox=proximal; ms= milissegundos; m/s= metros por segundo; mV= milivolts.

No 10º dia: 5 animais, entre 12, apresentaram velocidade de condução e amplitude dos PAMC reduzidas, com latência distal prolongada (Tabela 5).

Tabela 6- Eletroneurografia- Ciático NAE - 30º dia.

Animal	Latência	VC (m/s)	Amplitude (mV)		Duração (ms)	
	Distal (ms)		Distal	Prox	Distal	Prox
Cx1A4	0,96	38,7	4,7	3,9	1,1	1,1
Cx1A5	0,83	38,8	3,6	3	0,9	1
Cx2A2	1,08	47,9	4,6	2,4	0,9	1,3
Cx1RA3	0,67	62,5	42,4	40,3	1,2	1,2
Cx1RA5	0,67	61,9	32,7	31,6	1,3	1,3
Cx2VA3	0,67	62,5	54,2	49,4	1,3	1,3

Legenda: Prox= proximal, ms= milissegundos; m/s= metros por segundo; mV= milivolts.

No 30º dia: foi verificado aumento da latência distal, redução da velocidade de condução nervosa e amplitudes reduzidas em 3 animais, dos 6 avaliados. Os 3 animais avaliados no 10º e 30º dia (Cx1RA3, Cx1RA5, Cx2VA3) não apresentaram alterações no estudo da condução (Tabela 6).

Conclui-se, portanto, que, independente do tempo de realização do exame (10º e 30º dias) e do nervo estudado (caudal ou ciático), as alterações da VC caracterizam uma neuropatia primariamente mielinica com provável degeneração axonal associada.

4.3. Aspectos histopatológicos

Figura 1: Raíz nervosa - Neurite alérgica experimental 28ºdia pós-inoculação. Intenso Infiltrado mononuclear no epineuro. Infiltrado endoneural fascicular, incluindo a região subperineural constituído predominantemente por células mononucleares.

Figura 2: Grupo NAE- Nervo Ciático 28º dia p.i.: (A)-Infiltrado epineural intenso e (B) infiltrados esparsos no endoneuro.

Figura 3: Grupo NAE- Raíz nervosa 36º dia p.i.: Intenso infiltrado inflamatório nerivascular.

5.DISSCUSSÃO

5.DISCUSSÃO

Os camundongos fêmeas foram escolhidos, pois são considerados mais susceptíveis às doenças autoimunes (VOSKUHL, 2011). O peptídeo P2 da MNP foi utilizado no presente estudo por ser um antígeno neuritogênico para camundongos SJL/J (TAYLOR & HUGHES, 1985). Outro grupo também utilizou P2 e obteve resultados positivos, embora exclusivamente do ponto de vista eletrofisiológico (DIEPERINK, *et al.*, 1991).

No presente trabalho, parte do método simplificado SHIRPA foi selecionado, para análise do desempenho motor, por utilizar protocolos padronizados para avaliação funcional e comportamental. Esses protocolos oferecem uma medida razoavelmente sensível para a quantificação da expressão fenotípica no camundongo. Pode servir para testar a função específica de vias neurais, que, por sua vez, contribuem para uma maior compreensão de doenças neurológicas (ROGERS *et.al*, 1997).

O primeiro estudo publicado, indicando que o camundongo SJL é susceptível à NAE incluiu avaliações clínico-neurológicas e histológicas (TAYLOR & HUGHES, 1985). As alterações clínicas foram caracterizadas por fraqueza das patas posteriores, ataxia, tremor espontâneo e costas arqueadas. Essas alterações ocorreram em 8 dos 16 animais entre o 35º e o 40º dias pós-inoculação com BPM. Posteriormente (ROSTAMI, 1990) foi observado que 3 de 5 camundongos da cepa SJL H^s imunizados desenvolveram NAE, clinicamente caracterizada por uma abrupta queda de peso – também observada no trabalho anterior (TAYLOR & HUGHES, 1985) –, queda da cauda e fraqueza para abduzir os pododáctilos. Embora tendo estendido o tempo de observação por 132 dias, outro grupo de investigadores não encontrou alterações clínicas nos animais SJL/J (DIEPERINK, *et. al*, 1991). Chama a atenção o fato de que esses autores, além de usarem mielina bovina e adjuvante completo de Freund (AFC) para imunizar os camundongos, também usaram toxina pertussis para reforçar a imunização. Mesmo assim não houve distúrbios clínicos. Em estudo posterior, (CALIDA, *et. al*, 2000) 3 diferentes esquemas de imunização foram utilizados em 3

grupos de animais: mielina bovina do nervo periférico (MBNP), AFC, TP e IL-12 murina; MBNP, AFC e TP e, finalmente MBNP e AFC. O grupo controle foi tratado com PBS, AFC e TP. As alterações encontradas foram notáveis: 100 % dos grupos experimentais (total de 22 camundongos) apresentaram manifestações clínicas em contraposição à ausência de distúrbios clínicos nos controles. Foi utilizada uma graduação de déficits que variou de 0 (ausência de sinais clínicos) a 4 (morte), sendo 1 queda cauda, 2 paresia leve e 3 paresia grave. O déficit máximo da maioria dos animais foi graduado entre 1 e 2. Menor número de animais teve déficit máximo graduado entre 0 e 1. A notar que a diferença de gravidade entre a primeira associação de imunógenos (MBNP, AFC, TP e IL-12 murina) e o segundo grupo (MBNP, AFC e TP) foi apenas na maior precocidade do dia de início dos sinais clínicos, não havendo diferença estatisticamente significativa entre a intensidade dos sinais clínicos de ambos os grupos. Diferentemente do observado até então por outros autores, os animais desse experimento não mais apresentavam sinais clínicos entre o 32º e o 40 º dias após a imunização. Os autores atribuem a diferença entre este e outros estudos à maior quantidade de mielina bovina (2,5 mg) utilizada, em contraposição à utilizada nos estudos prévios (0,1 mg) (CALIDA *et al.*, 2000). A observação de comprometimento de 100% dos animais, imunizados na mesma faixa etária do estudo anterior, com o esquema MBNP, AFC TP e IL-12 murina (XIA, YOSEF e UBOGU, 2009; XIA, YOSEF e UBOGU, 2010) foi comprovada. O período de início dos sinais, 9 a 13 dias após a imunização e a duração das alterações clínicas (até 63 dias) foram claramente diferentes. Na tentativa de reproduzir o modelo de NAE, usando sequência neuritogênica de peptídeos P2, associada a AFC e TP, no presente estudo foi inoculado o dobro da dose utilizada por outros autores que conseguiram NAE em camundongos C57BL/6 (TAYLOR & HUGHES, 1985; ZHU, NENNESMO e DENG, 1999). Não foram encontradas diferenças significativas na avaliação clínico-neurológica dos camundongos imunizados, quando comparados aos controles, ou seja, os resultados do presente trabalho se assemelharam aos dos autores que usaram menos de 2,5 mg de mielina bovina do nervo periférico. Não constatamos nenhuma alteração, ou seja, grau 0 para ambos os grupos, o que representa estado normal do animal segundo a escala utilizada (KING *et al.*, 1983). No estudo que propôs a análise de NAE em

camundongos SJL/J comparando-os aos ratos lewis foi possível constatar que não houve anormalidade clínica perceptível nos camundongos, apenas danos subclínicos à mielina do nervo periférico. Os ratos Lewis desenvolveram fraqueza nas patas e perderam peso, demonstrando assim que estes são mais susceptíveis, pois os resultados são mais exuberantes que os encontrados nos camundongos SJL/J (DIEPERINK *et.al.*, 1991). Os controles AFC não mostraram nenhuma alteração clínica nem histológica, compatíveis com a literatura (ROSTAMI, 1990 e DIEPERINK *et. al.*, 1991). Mesmo quando utilizado TP em associação com IL-12 recombinante sem mielina bovina do nervo periférico (BPNM) a doença não ocorreu (XIA, YOSEF e UBOGU, 2010).

Os camundongos SJL mostraram um período de perda de peso do 4º ao 18º dias pós imunização tanto no grupo NAE quanto no grupo controle (TAYLOR & HUGHES, 1985). Neste trabalho, não houve alteração significativa quanto a variável peso em nenhum dos grupos durante todos os dias relatados de análise. Contudo, segundo estudo aqui mencionado, o peso corporal de animais que forem alojados em grupo, como ocorrido em nosso laboratório, pode reduzir em comparação a animais alojados individualmente. Com isso é possível afirmar que, quando esta alteração estiver presente, poderá não ser, necessariamente, um indicativo de sucesso na indução da doença, e sim ao ambiente em que o animal estiver alocado. (KULESSKAYA, RAUVALA e VOIKAR, 2011).

A linhagem em questão é considerada a mais susceptível, quando comparada às outras linhagens em relação às quais se tentou produzir NAE. Um exemplo é o estudo, no qual foi feita a tentativa de indução da doença com o uso de proteína P2 da mielina do nervo periférico e foi constatado não mais que um curso leve da NAE. Entretanto, é afirmado que utilizando-se um protocolo estendido com TP associada a IL-12 os sinais podem ser intensos nesta mesma linhagem (HORSTE *et al.*, 2008). No entanto, outros grupos fizeram uso deste protocolo sem sucesso notável. Os achados são, de fato discretos, apesar de ter sido relatado o aparecimento dos sinais mais precocemente que o evidenciado, quando utilizada exclusivamente proteína da mielina (CALIDA *et. al.*, 2000, XIA, YOSEF e UBOGU, 2009; XIA, YOSEF e UBOGU, 2010). Vale ressaltar que, apesar desse modelo ser considerado reprodutível, não há muitas publicações utilizando-o.

No estudo inicial com camundongos SJL/J (TAYLOR & HUGHES, 1985) foi observado que as características histológicas da NAE se assemelham às encontradas em ratos *Lewis* e na síndrome de Guillain-Barré no homem com a ocorrência de desmielinização e preservação dos axônios em regiões de infiltração celular. A susceptibilidade dos camundongos SJL foi considerada ser cerca de 10 vezes menor que a dos ratos *Lewis*, como afirmam os investigadores acima citados. Esses pesquisadores utilizaram MBNP em um grupo de animais e P2 em outro, ambos combinados com AFC. Outro grupo de investigadores que utilizou MBNP com AFC encontrou evidências de desmielinização e infiltrado celular na raiz dorsal e no nervo ciático de camundongos SJL/J. Nos animais injetados apenas com AFC não se constataram alterações (ROSTAMI, 1990). Em outro estudo, secções de nervo periférico de animais imunizados com mielina do SNP continham áreas de desmielinização focal e infiltrado celular inflamatório. Porém, de 12 camundongos estudados, apenas um mostrou inflamação nas raízes nervosas e os demais tiveram alterações confinadas apenas ao nervo ciático com a maior parte das lesões restrita à sua porção distal (DIEPERINK *et. al*, 1991). No estudo que evidenciou alterações clínicas mais intensas (CALIDA *et. al*, 2000), o nervo ciático e a cauda equina isolados de camundongos recuperados da doença clínica apresentavam marcada desmielinização, sem qualquer evidência de degeneração axonal significativa. No estudo de fibras dissociadas foi constatada desmielinização paranodal e segmentar, “com ou sem ovóides de mielina no citoplasma das células de Schwann”. O infiltrado de células mononucleares foi mínimo em todas as secções examinadas na fase em que a avaliação histopatológica foi realizada (40-50 dias p.i). Secções no grupo com PBS + AFC + TP não evidenciaram desmielinização. Outro estudo que fez uso de IL-12, além de MBNP, evidenciou desmielinização multifocal ou difusa com perda axonal no nervo ciático, em associação com infiltrados de células mononucleares (XIA, YOSEF e UBOGU, 2010). Houve correlação entre a graduação e a contagem de células inflamatórias: o infiltrado mononuclear, assim como a desmielinização e perda axonal estiveram relacionados com a fraqueza neuromuscular.

Encontramos infiltrado inflamatório epineural em apenas 3 dos animais, sendo que um deles apresentou infiltrado endoneural. Os nossos resultados se

aproximam dos de um dos referidos grupos de investigadores (DIEPERINK *et al.*, 1991).

“NAE é uma doença monofásica com evidências eletrofisiológicas de uma polineuropatia desmielinizante difusa com perda axonal manifestas no pico da doença” (XIA, YOSEF e UBOGU, 2010)”. No estudo eletrofisiológico, realizado por esses investigadores, foram detectadas latências distais prolongadas, redução da velocidade de condução e amplitude, bloqueio de condução, dispersão temporal e respostas tardias prolongadas no pico de gravidade da doença, que ocorreu entre 26º e 32º dias, em 10 dos 24 animais SJL/J estudados. Tais achados não foram encontrados nos controles. Como foi destacado em parágrafo anterior, houve distúrbios clínicos em 100% dos animais. Fazendo avaliação eletroneuromiográfica dos animais do presente estudo, constatamos que cerca de quase metade dos animais imunizados apresentou alterações eletrofisiológicas, sugerindo uma neuropatia primariamente desmielinizante com perda axonal associada. Deve aqui ser reforçado que o nosso modelo não incluiu a adição de IL-12 como no daqueles autores (XIA, YOSEF e UBOGU, 2009). Embora não tenham sido constatados sinais neurológicos, os resultados do presente estudo diferem temporalmente dos daqueles referidos por esses autores. Coincidem no referente à frequência das alterações eletrofisiológicas, 42,3% dos animais naquele estudo e, 43,2% nos nossos. Seria esperado que todos os animais estudados por aqueles autores tivessem distúrbios eletrofisiológicos, uma vez que todos apresentaram distúrbios motores na avaliação clínica. Os nossos achados, do ponto de vista qualitativo se sobrepõem aos do referido trabalho (XIA, YOSEF e UBOGU, 2009).

O outro estudo que incluiu eletroneuromiografia, utilizando diferentes associações de imunógenos, evidenciou predominantemente alterações eletrofisiológicas, eventuais alterações histológicas e ausência de alterações neurológicas (DIEPERINK *et al.*, 1991). Quando os autores imunizaram 29 animais exclusivamente com mielina humana, o estudo eletrofisiológico sequencial do nervo ciático associou-se a alterações eletrofisiológicas axonais e desmielinizantes no 40º dia p.i. Ao imunizar 11 animais com mielina humana emulsificada em AFC, associados à toxina pertussis foram registradas alterações tanto desmielinizantes, quanto axonais no nervo ciático no 20º e 40º dia p.i. Ao utilizarem mielina bovina, associada a AFC em

14 animais, foram registradas alterações desmielinizantes no 40^o, 54^o, 67^o e 82^o dias p.i. Ao usarem P2 com AFC, 25 animais apresentaram alterações exclusivamente desmielinizantes. Os achados do presente estudo assemelham-se exclusivamente ao encontrado por aqueles autores, quando associaram mielina humana, AFC e pertussis. O protocolo de imunização, usado por aqueles autores que mais se aproximou do utilizado no presente estudo, foi o da associação de P2 com AFC. Tal associação difere da aqui utilizada porque no presente estudo foi adicionada pertussis. Além disso, no presente trabalho, foram utilizados 200µg de peptídeos neuritogênicos de P2, ao invés dos 100µg de proteína P2 do protocolo daqueles autores. A dose maior pode ser a razão do encontro de lesões desmielinizantes e prováveis alterações axonais associadas, ao invés de lesões exclusivamente desmielinizantes. Aspectos relevantes para o sucesso na indução da NAE podem estar relacionados à dosagem dos imunógenos utilizados, pois nos estudos acima mencionados as dosagens foram diferentes, evidenciando com isso maior ou menor grau de intensidade e agravamento da doença.

Estudos futuros são fundamentais para melhor analisar e descrever as lesões e as alterações encontradas, pois a pouca intensidade de acometimento da injúria nesse modelo animal pode ser indicativa da necessidade de serem estudadas outras linhagens mais susceptíveis. Por apresentar altas taxas de indução em ratos, por exemplo, o rato Lewis, bem como, semelhanças patológicas com PDIA no homem, a NAE é considerada um modelo robusto para o estudo da patogênese da inflamação do nervo periférico humano. A vasta quantidade de ferramentas disponíveis no mercado e seu acesso para o estudo de doenças auto-imunes em camundongos validam a procura pela cepa ideal de camundongos.

As doenças que envolvem o SNP são conhecidas em inúmeras espécies mas, apesar das desordens neurológicas em animais serem conhecidas desde o século XVII, os estudos neuropatológicos são recentes (SUMMERS *et al.*, 1995).

A compreensão dos mecanismos imunorregulatórios do sistema nervoso periférico é importante para o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento mais específicos e, por conseguinte, eficazes. A elucidação desses mecanismos e seus

distúrbios na doença humana e em seu modelo experimental podem ser também de interesse para neuropatias de origem genética.

O presente estudo evidenciou que, possivelmente, o fator principal que permite o desenvolvimento da NAE no camundongo SJL/J é a adição de IL-12 murina e um grande aumento da dose de mielina bovina. Aumentos exclusivos dessa dose, como utilizamos neste estudo, não determinam alterações clínicas e as alterações eletrofisiológicas não ocorrem em todos os animais. Deve ser notado que, mesmo utilizando mielina bovina em altas doses, adjuvante de Freund completo, toxina pertussis e IL-12 murina a reprodução do modelo não é superponível temporalmente. O curso referido pelos autores (CALIDA *et al.*, 2000) que descreveram o modelo, inicialmente indicou um nadir do 28º ao 30º dias e uma evolução até o 40º dia, embora 100% dos animais tenham apresentado alterações motoras. Em contraposição, outros autores, usando o mesmo protocolo, observaram nadir do 26º ao 32º dias e evolução até o 63º dia (XIA, YOSEF e UBOGU.2009).

Essa variabilidade certamente é devida à necessidade do uso de grande variedade de indutores da NAE. Os nossos achados e os da literatura são indicativos de que ainda não se encontrou um modelo no camundongo comparável ao que se obtém no rato *Lewis*, que apresenta grande reprodutibilidade em intensidade de sinais motores e temporalidade de tais sinais em muitos laboratórios de diferentes países.

6.CONCLUSÕES

6.CONCLUSÕES

A imunização de camundongos SJL/J com peptídeo P2, AFC e Toxina pertussis examinados sequencialmente durante 60 dias permitiu verificar que:

- não há distúrbios motores clinicamente detectáveis;
- ocorrem alterações eletrofisiológicas em cerca de 40% dos animais que podem ser reversíveis ao longo do tempo;
- eventual e escasso infiltrado mononuclear endoneural ocorre em poucos animais, alguns desses, podendo apresentar infiltrados epineurais intensos.

Trata-se de um modelo precário de neurite alérgica experimental, não sendo comparável a intensidade das alterações encontradas às que ocorrem no modelo mais referenciado na literatura, a neurite alérgica experimental em ratos Lewis.

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAO L; LINDGREN, J.U, VAN DER MEIDE, P; ZHU, S; LIUNGGREN, H.G; ZHU, J. The critical role of IL-12p40 in initiating, enhancing, and perpetuating pathogenic events in murine experimental autoimmune neuritis. *Brain Pathol.* Oct 12(4):420-9, 2002.

BAO L; LINDGREN, J. U; ZHU, Y; LJUNGGREN, H-G; ZHU, J. Exogenous soluble tumor necrosis factor receptor type I ameliorates murine experimental autoimmune neuritis. *Neurobiol. Dis.* v.12, p.73–81, 2003.

BOGDAN, C; ROLLINGHOFF, M; DIEFENBACH, A. The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol.*, v.173, p.17-26, 2000.

BROSTOFF, S; BURNET, P.; LAMPERT, P.; EYLAR, E.H. Isolation and characterization of a Protein from Sciatic Nerve Myelin responsible for Experimental Allergic Neuritis. *Nat New Biol.* feb 16, v.235 (59): p.210-2, 1972.

BRUNN, A; UTERMO, OH; CARSTOV, M; SANCHEZ-RUIZ, M; MILETIC, H; TER, DS; DECKERT, M. CD4 T Cells Mediate Axonal Damage and Spinal Cord Motor Neuron Apoptosis in Murine P0106–125-Induced Experimental Autoimmune Neuritis. *The American Journal of Pathology*, Vol. 173, No. 1, July 2008

BRUNN, A; UTERMOHLEN, O; SANCHEZ-RUIZ, M; MONTESINOS-RONGEN, M; BLAU, T; SCHLUTER, D; DECKERT, M. Dual role of B cells with accelerated onset but reduced disease activity in P0106–125-induced experimental autoimmune neuritis of IgH^{0/0} mice. *Acta Neuropathol*, v.120: p.667–681, 2010.

CALIDA DM, KREMLEV SG, FUJIOKA T, HILLIARD B, VENTURA E, CONSTANTINESCU CS, LAVI E, ROSTAMI A. Experimental allergic neuritis in SJL/L mouse: induction of severe and reproducible disease with bovine peripheral nerve myelin and pertussis toxin with or without interleukin-12. *J Neuroimmunol*, v. 107, p. 1-7, 2000.

CANTHABOO, C; XING, D; WEI, X.Q; CORBEL, M.J. Investigation of Role of nitric oxide in protection from Bordetella pertussis respiratory challenge. *Infect. immun.*, v.70, p.679-684, 2002.

CASSIS, L; AIELLO, S; NORIS, M. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Contrib Nephrol.*:146, p.121-31, 2005.

DIEPERINK, EM.; O'NEIL, A.; MASELLI, R.; STEFANSSON, K. Experimental allergic neuritis in the SJL/J mouse: dysfunction of peripheral nerve without clinical signs. *J neuroimmunol*: v. 35, p.247-259, 1991.

DERETZI, G.; PELIDOU, D.H.; ZOU, L.P.; QUIDING, C.; MIX, E.; LEVI, M.; WAHREN B; ZHU J. Suppression of chronic experimental autoimmune neuritis by nasally administered recombinant rat interleukin-6. *Immunol*, v. 97, p: 69–76, 1999.

DUAN RS; CHEN, Z; BAO, L; QUEZADA, H C; NENNESMO, I; WINBLAD, B; ZHU J. CCR5 deficiency does not prevent P0 peptide 180–199 immunized mice from experimental autoimmune neuritis. *Neurobiol Dis*, v.16, p. 630– 637, 2004.

DUAN RS.; JIN T.; YANG X.; MIX, E.; ADEM, A.; ZHU, J. Apolipoprotein E deficiency enhances the antigen-presenting capacity of Schwann cells. *Glia* 55, 772–776, 2007.

FORSTERMANN, U; SESSA, C. W. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*. Apr;33(7): p.829-37,Sep 1, 2011.

GARSSEN M. P. J.; JOLEEN, H.; BLOK, PIETER A; DOORN, V.; VISSER, G. H. Conduction velocity distribution in neurologically well-recovered but fatigued Guillain-Barré syndrome patients. *Muscle Nerve* 33: 177–182, 2006.

GOLD R; HARTUNG, H.P; TOYKA, KV. Animal models for autoimmune demyelinating disorders of the nervous system. *Mol Med Today*.: Feb;6(2):88-91, 2000.

HAHN, A.F; FEASBY, T.E; STEELE, A; LOVGREN, D.S; BERRY, J. Demyelination and axonal degeneration in Lewis rat experimental allergic neuritis depend on the myelin dosage. *Lab Invest*: 59(1); p.115-25,1988.

HARTUNG H.P.; SCHOFFER, B.; VAN DER MEIDE, P.H.; FIERZ, W.; HEININGER, K. The role of interferon gamma in pathogenesis of experimental autoimmune disease of the peripheral nervous system. *Ann.Neurol*. 27, p.247-257, 1990.

HARTUNG H.P; TOYKA KV. T-cell and macrophage activation in experimental allergic neuritis and Guillain-Barré syndrome. *Ann Neurol*: 27; p.57-63, 1996.

HATCHER, JP.; JONES, D.C.; ROGERS, D.C.; REAVILL, C.; HAGAN, J.J.; HUNTER, A.J. Development of SHIRPA to characterize the phenotype of gene-targeted mice. *Behav Brain Res*: v.125, p.43-47, 2001.

HELM T. Basic immunology: a primer. *Minn Med*.: 87(5), p.40-4, 2004.

HORSTE G. M. Z; HU, W; HARTUNG, H. P; LEHMANN, H. C.; KIESEIER, B. C. The immunocompetence of schwann cells. *Muscle Nerve* v.37: p.3–13, 2008

HORSTE, G. M. Z.; MAUSBERG, A. K.; MULLER J. I.; LEHMANN, H. C.; LOBER ,S.; GMEINER, P.; HARTUNG, H-P; STUVE, O.; KORTH, C.; KIESEIER,

B C. Quinpramine Ameliorates Rat Experimental Autoimmune Neuritis and Redistributes MHC Class II Molecules. *PLoS One*: 6(6): e21223, 2011.

HOSFFMAN, P.M.; POWERS, J.M.; WELSE, M.J.; BROSTOFF, S.W., Experimental allergic neuritis- Rat strain differences in the response to bovine myelin antigens. *Brain Res.*: v.195, p. 355-362, 1980.

JANEWAY, C. A. Jr.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.*: v. 20: p.197-216, 2002.

JACQUELIN, C.; STRAZIELLE, C.; LALONDE, R. Neurologic function during developmental and adult stages in Dab1scm(scrambler) mutant mice. *Behav Brain Res*: v. 226, p. 265– 273, 2012.

JESSEN, K. R.; MIRSKY, R. Neural development. Fate diverted. *Curr Biol*: 4, n. 9, p. 824-827, 1994.

JESSEN, K. R; MIRSKY, R. Embryonic Schwann cell development: the biology of Schwann cell precursors and early Schwann cells. *J Anat.* Nov: 191, p. 501-5, 1997.

KING, R.H; CRAGGS, R.I; GROSS, M.L; TOMPKINS, C; THOMAS, P.K. Suppression of experimental allergic neuritis by Ciclosporin-A. *Acta Neuropathol*, v.4, p. 262-268, 1983.

KIEFER, R; KIESEIER, C. B; STOLL, G; HARTUNG, H.P. The role of macrophages in immune-mediated damage to the peripheral nervous system. *Progress in Neurobiol.*: v.64, p. 109–127, 2001.

KIM, J.; BASAK, J.M.; HOLTZMAN; D.M. The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron*. v.63, p.287–303, 2009.

KOBAYASHI, M; FITZ, L; RYAN, M; HEWICK, R.M; CLARK, S.C; CHAN, S; LOUDON, R; SHERMAN, F; PERUSSIA, B; TRINCHIERI, G. . Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor, a cytokine with multiple biological effects on human lymphocytes. *J Exp Med*, v.170: p.827-845,1989.

KOSKI, C.L.. Mechanisms of Schwann cell damage in inflammatory neuropathy. *J. Infect. Dis.* v.176, p.169–172, 1997.

KULESSKAYA, N; RAUVALA, H; VOIKAR, V. Evaluation of Social and Physical Enrichment in Modulation of Behavioural Phenotype in C57BL/6J Female Mice. *PLoS ONE*: 6(9): e24755, 2011.

LALONDE, R; DUMONT, M; STAUFENBIEL, M; STRAZIELLE, C. Neurobehavioral characterization of APP23 transgenic mice with the SHIRPA primary screen. *Behav Brain Res*: v.157; p. 91–98, 2005.

LENSCHOW D. J, WALUNAS T. L, BLUESTONE J. A. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol.* : v.14:p.233-58; 1996.

LU, MO; DUAN, RS; QUEZADA, H C; CHEN, ZG; MIX, E; JIN, T; YANG, X; LJUNGGREN, HG, ZHU, J. *J. Neuroimmunol.*: v. 186, p.19–26, 2007.

LU, MU; ZHU, JIE. The role of cytokines in Guillain–Barre´ syndrome. *J Neurol*: v.258:533–548, 2011.

LIPPOLIS, J.D. Immunological signaling networks: integrating the body's immune response. *J Anim Sci.* Apr; v.86: p.53-63, 2008.

MAJAVA, V; POLVERINI, E; MAZZINI, A; NANEKAR, R; KNOLL, W; PETERS, J; NATALI, F; BAUMGARTEL, P; KURSULA, I; KURSULA, P. Structural and Functional Characterization of Human Peripheral Nervous System Myelin Protein P2. *PLoS ONE*: Apr 22;5(4): e10300, 2010.

MAO, XJ; ZHANG, XM; ZHANG, HL; QUEZADA, HC; MIX, L; YANG, X; WINBLAD, B; ADEM, A; ZHU, J. TNF- α receptor 1 deficiency reduces antigen-presenting capacity of Schwann cells and ameliorates experimental autoimmune neuritis in mice. *Neurosci Lett* : v.470, p. 19–23, 2010.

MAURER, M; TOYKA, K.-V; GOLD, R. Cellular immunity in inflammatory autoimmune neuropathies. *Rev Neurol (Paris)*.: Dec;158(12 Pt 2):S7-15, 2002 (a).

MAURER, M; TOYKA, K.-V; GOLD, R. Immune mechanisms in acquired demyelinating neuropathies: lessons from animal models. *Neuromuscul Disord*.: May;12(4):405-14, 2002(b).

MIRSKY, R; PARKINSON, D.B; DONG, Z; MEIER, C; CALLE, E; BRENNAN, A; TOPILKO, P; HARRIS, B.S; STEWART, H.J; JESSEN, K.R. Regulation of genes involved in Schwann cell development and differentiation. *Prog Brain Res*: 132, p. 3-11, 2001(a)

MONCADA, S; HIGGS, E.A. The Discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol*, v.147, p193-201,2006.

MUNOZ, J.J.; ARAI, H.; BERGMAN, R.K.; DADOWSKI, P.L. Biological activities of crystalline pertussigen from *Bordetella pertussis*. *Infect.immunol*: 333, p.820-826, 1981.

NATHAN C. Points of control in inflammation. *Nature*. Dec 19-26;420(6917):846-52, 2002.

NICHOLSON, L. B.; KUCHROO,V. Manipulation of Th1/Th2 balance of autoimmune diseases. *Curr Opinion Immunol*, v.8,n.6,p.837-842,Dez.1996.

- NYATI, K.K; PRASAD, N.K; VERMA, A; PALIWAL, K.V. Correlation of Matrix Metalloproteinases-2 and -9 with Proinflammatory Cytokines in Guillain-Barre´ Syndrome. *J Neurosci Res* 88:3540–3546, 2010.
- RAM, M; SHERER, Y; SHOENFELD, Y. Matrix Metalloproteinase-9 and Autoimmune Diseases. *J Clin Immunol*. Jul;26(4):299-307, 2006.
- RALL, S.C. Jr.; WEISGRABER, K.H.; MAHLEY, R.W.. Human apolipoprotein E. The complete amino acid sequence. *J. Biol. Chem.* v.257, p.4171–4178, 1982.
- ROGERS, D.C.; FISHER, E.M.C.; BROWON, S.D.M; PETERS J.; HUNTER, A.J.; MARTIN, J.E. Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed for comprehensive phenotype assessment. *Mamm Genome*: 8, p.711-713, 1997.
- ROMAGNANI S. Regulation of the T cell response. *Clin Exp Allergy*.: Nov;36(11):1357-66, 2006
- ROSTAMI, A.M. Comparative Study of Experimental Autoimmune Neuritis in SJL mice and Lewis rats. *Immunol Res*. v.9, p.314-319, 1990.
- ROSTAMI, A.; GREGORIAN, S.K. Peptide 53–78 of myelin P2 protein is a T cell epitope for the induction of experimental autoimmune neuritis. *Cell. Immunol*. 132 (2), 433–441, 1991.
- ROSTAMI, A. M. P2 – reactive T cells in inflammatory demyelination of the peripheral nerve. *J. Infect. Dis.*: 176, p.160-163, 1997.
- RYAN M; MCCARTHY L; RAPPUOLI R; MAHON B. P; MILLS K H. G. Pertussis toxin potentiates Th1 and Th2 responses to co-injected antigen: adjuvant action is associated with enhanced regulatory cytokine production and expression of the co-stimulatory molecules B7-1, B7-2 and CD28. *Int Immunol*: v. 10, (4), p. 651–662, 1998.
- SUMMERS, B.A.; CUMMINGS, J.F.; LAHUNTA, A. Veterinary Neuropathology. *St. Louis: Mosby*, p.527,1995.
- SUN, B; LI, HL; WANG, JH; WANG, GY; ZHAO, R; MU, L.L; JIN, L.H. Passive transfer of experimental autoimmune neuritis by IL-12 and IL-18 synergistically potentiated lymphoid cells is regulated by NKR-P1+ cells. *Scand J Immunol*.: May;65(5):412-20, 2007.
- SMITH, A.M; GUZMÁN, C.A; WALKER, M.J. The virulence factors of Bordetella pertussis: a matter of control. *FEMS Microbiol Rev.*, v.25, p.309-333, 2001.

STERN, A.S; PODLASKI, F.J; HULMES, J.D; PAN, YC; QUINN, PM; WOLITZKY, AG; FAMILLETTI, PC; STREMLLO, DL; TRUITT, T; CHIZZONITE, R et al. Purification to homogeneity and partial characterization of cytotoxic lymphocyte maturation factor from human B-lymphoblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.87: p.6808–6812, 1990.

SWANBORG, R. H. Experimental autoimmune encephalomyelitis in the rat: lessons in T-cell immunology and autoreactivity. *Immunol Rev.*: Dec;184:129-35, 2001.

SPAANS. F; VREDEVELD, J.W; MORRÉ, H.H.E; JACOBS, B.C; DEBAETS, M.H. Dysfunction at the motor end-plate and axon membrane in Guillain-Barré syndrome: A single-fiber EMG study. *Muscle Nerve*: 27(4), p.423-34, 2003.

SZABO, S.J; SULLIVAN, B.M; PENG, S.L; GLIMCHER, L.H. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol*. Epub 2001 Dec19 Review. 21:713-58; 2003.

TAYLOR, W.A.; HUGHES, R.A. Experimental allergic neuritis induced in SJL mice by bovine P2. *J. Neuroimmunol*: 8, p. 153-57, 1985.

TIVOL EA, BORRIELLO F, SCHWEITZER AN, LYNCH WP, BLUESTONE JA, SHARPE AH. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity*: 3, p.541–547, 1995

TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and interferon-gamma. Do they always go together?. *Am J Pathol*. December; 147(6): 1534–1538, 1995.

VOSKUHL, RHONDA. Sex differences in autoimmune diseases. *Biol sex differ*, 2011.

WAKSMAN, B.H.; ADAMS, R.D. Allergic neuritis: an experimental disease of rabbits induced by the injection of peripheral nervous tissue and adjuvants. *J. Exp. Med.*: 102, p.213-236, 1955.

WAKSMAN, B.H.; ADAMS, R.D. A comparative study of experimental allergic neuritis in the rabbit, guinea pig and mouse. *J. Neuropathol. Exp.*: 15, p.293-331, 1956

WATERHOUSE P, PENNINGER JM, TIMMS E, WAKEHAM A, SHAHINIAN A, LEE KP, THOMPSON CB, GRIESSER H, MAK TW. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in CTLA-4. *Science*: 270,p. 985–988, 1995

WILLIAM, A.S.; PETER, O.B. Experimental allergic neuritis: a new experimental approach. *J Neurol Neurosurg Psych*, , v.36, p.139-145,1973.

WHITAKER, J.N. The antigenic reactivity of small fragments derived from human myelin basic protein peptide 43-88. *J Immunol.*: Dec;129(6):2729-33,1982.

YONG, T; MEININGER, G.A; LINTHINCUM, D.S. Enhancement of histamine-induced vascular leakage by pertussis toxin in SJL/J mice but not BALB/c mice. *J Neuroimmunol.*: 45(1-2):47-52, 1993.

YU, SHUO; DUAN,RUI-SHIENG; CHEN, ZHIGUO; QUEZADA, HERNAN CONCHA; BAO, LEI; NENNESMO, INGER; ZHU, SHUN-WEI; WINBLAD, BENGT; LJUNGGREN, HANS-GUSTAF; ZHU,JEI . Increased Susceptibility to Experimental Autoimmune Neuritis after Upregulation of the autoreactive T Cell response to peripheral myelin antigen in apolipoprotein E-Deficient mice. *J. of neurophatol and experimental neurol.*: 63, p. 120-128, 2004.

XIA R H.; YOSEF N; UBOGU, E E. Clinical, electrophysiological and pathologic correlations in a severe murine experimental autoimmune neuritis model of Guillain-Barré syndrome. *J Neuroimmunol*, Feb 26;219(1-2), p.54-63, 2009.

XIA R H.; YOSEF N; UBOGU, E. E. Selective expression and cellular localization of pro-inflammatory chemokine ligand/receptor pairs in the sciatic nerves of a severe murine experimental autoimmune neuritis model of Guillain-Barré syndrome. *Neuropathol Appl. Neurobiol*, aug 36(5), p.388-98, 2010.

XIE, Q.W.; CHO, H.J.; CALAYCAY,J.; MUMFORD, R.A.; SWIDEREK, K.M.; LEE, T.D.; DING, A.; TROSO, T.; NATHAN, C. Cloning and characterisation of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science*, v. 256, p.225-228, 1992.

ZHAO, L.X, LI, Z.G, SUN, B, ZHANG, L.Z, YIN, H.Y,TIAN, S.Y, LI,H, LI, L.H, WANG, S.D, ZHONG, D. MMP-mediated cleavage of b-dystroglycan in myelin sheath is involved in autoimmune neuritis. *Biochem Biophys Res Commun*, Feb 19; v.392(4): p.551-6, 2010.

ZHANG, H.L; WU, J; ZHU, J. The role of apolipoprotein E in Guillain-Barré syndrome and experimental autoimmune neuritis. *J Biomed Biotechnol*: Feb 16. Review, 2010.

ZHANG, HL; MAO, XJ; ZHANG, XM; LI, HF; ZHENG, XY; ADEM, A; MIX, E; ZHU, J. APOE ε3 attenuates experimental autoimmune neuritis by modulating T cell,macrophage and Schwann cell functions. *Exp Neurol*: v.230, P. 197–206, 2011.

ZOU, L-P; JUNGREN, H-G L; LEVI, M; NENNESMO, I; WAHREN, B; MIX, E; WINBLAD, B; SCHALLING, M; ZHU, JIE. P0 Protein Peptide 180-199 Together With Pertussis Toxin Induces Experimental Autoimmune Neuritis in Resistant C57BL/6 Mice. *J Neurosci Res* v.62: p.717–721, 2000.

ZHU, J; LINK, H; MIX, E; OLSSON, T; HUANG, W.X. Th1-like cell responses to peripheral nerve myelin components over the course of experimental allergic neuritis in Lewis rats. *Acta Neural Scand.*: 90(1),p.19-25, 1994.

ZHU, J; MIX, E; LINK, H. Cytokine production and the pathogenesis of experimental allergic neuritis and Guillain-Barré syndrome. *J. Neuroimmunol.*: v. 84, p. 40-52, 1998.

ZHU, J.; NENNESMO, I.; DENG, G.M. Induction of experimental autoimmune neuritis in CD-4-8C57B1/6 mice. *J Neuroimmunol*, v. 94, p. 196-203, 1999.

ZHU, Y; LJUNGGREN, H-G; MIX, E; LI, H-L; MEIDE, P V D; ELHASSAN, A. M.; WINBLAD, B; ZHU, J. Suppression of Autoimmune Neuritis in IFN-g Receptor-Deficient Mice. *Exp Neurol*: v.169, p.472–478, 2001.

ZHU, Y; BAO, L; ZHU, S; CHEN, Z; MEIDE, P V D; NENNESMO, I; WINBLAD, B; LJUNGGREN, H-G; ZHU, J. CD4 and CD8 T Cells, but Not B Cells, Are Critical to the Control of Murine Experimental Autoimmune Neuritis. *Exp Neurol* 177, 314–320, 2002.

ZHU, W; MIX, E; NENNESMO, I; ADEM, A; ZHU, J. Anti-cytokine autoantibodies in experimental autoimmune neuritis in Lewis rats. *Exp Neurol*: 190(2), p.486-94, 2004.

ZHU, W; ZHANG, K; EILHARD, M; WANG, X; ADEM, A; ZHU, J. Differential Susceptibility to Experimental Autoimmune Neuritis in Lewis Rat Strains is Associated with T-Cell Immunity to Myelin Antigen. *J Neurosci Res* 89: 448-456, 2011.

ZIELASEK, J; JUNG, S.; GOLD, R.; LIEW, F.Y; TOYKA, K.V.; HARTUNG, H.P. Administration of nitric oxide synthase inhibitors in experimental autoimmune neuritis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*, v.58, p.81-88, 1995.

8.APÊNDICES

APÊNDICES

1.TABELA DE MÉDIAS E DESVIOS PADRÕES DO MÉTODO DE AVALIAÇÃO FUNCIONAL ROTA ROD NOS DIAS ANALISADOS - GRUPO NAE

DIA	MÉDIA	DP
20º	72,00	40,77
25º	32,21	31,10
30º	73,00	31,97
35º	85,83	54,81
60º	80,56	31,43

Legenda: DP=Desvio padrão

2. TABELA DE MÉDIAS E DESVIOS PADRÕES DO MÉTODO DE AVALIAÇÃO FUNCIONAL ROTA ROD NOS DIAS ANALISADOS - GRUPO CONTROLE

DIA	MÉDIA	DP
0º	70,31	38,37
20º	38,42	39,96
30º	50,67	25,58

Legenda: DP=Desvio padrão

3.TABELA DE MÉDIAS E DESVIOS PADRÕES DO MÉTODO DE AVALIAÇÃO FUNCIONAL FORÇA DE GARRA NOS DIAS ANALISADOS - GRUPO NAE

DIA	MÉDIA	DP
10º	1,20	0,13
17º	0,96	0,08
30º	0,97	0,11
35º	1,25	0,15
60º	1,29	0,11

Legenda: DP=Desvio padrão

4.TABELA DE MÉDIAS E DESVIOS PADRÕES DO MÉTODO DE AVALIAÇÃO FUNCIONAL FORÇA DE GARRA NOS DIAS ANALISADOS- GRUPO CONTROLE

DIA	MÉDIA	DP
0º	1,39	0,20
17º	0,96	0,14
30º	0,87	0,15

Legenda: DP=Desvio padrão

9. TABELA DE MÉDIAS E DESVIOS PADRÕES DE AVALIAÇÃO DE PESO NOS DIAS DE MAIOR SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA E GRÁFICOS DOS GRUPOS NAE E CONTROLE

DIA	NAE MÉDIA	CONTROLE MÉDIA	NAE DP	CONTROLE DP	P (SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA)
9º	21,17	18,13	2,03	0,25	0,004
17º	22,04	18,75	2,01	0,96	0,005
18º	22,31	19,00	2,11	0,71	0,004
19º	22,35	18,50	2,25	0,71	0,002
24º	22,83	18,88	2,37	0,85	0,002

Legenda: DP=Desvio padrão

10. AVALIAÇÃO DA VARIÁVEL PESO

Na comparação entre os grupos NAE e Controle constatamos que houve diferença significativa na maioria dos dias, sempre com o grupo NAE apresentando valores superiores.

Na análise da relação entre o peso e os dias utilizamos o teste de Regressão linear. No período de 0 a 20 dias no grupo NAE obtivemos um ganho significativo de peso $P < 0,01$; $\text{Peso} = 19,72 + 0,14 \text{ dias}$. O mesmo ocorreu no grupo controle $P < 0,01$; $\text{Peso} = 17,33 + 0,11 \text{ dias}$. Não houve diferença significativa entre a taxa de ganho dos dois grupos.

No período de 20 a 40 dias o grupo NAE não apresentou variação significativa de peso, $P = 0,99$; $\text{Peso} = 22,54 + 0,0 \text{ dias}$). Já os controles continuaram apresentando um ganho de peso ($P = 0,3$; $\text{Peso} = 18,84 + 0,04 \text{ dias}$).