Nilton Barreto dos Santos

Participação dos Glicocorticoides na progressão e no prejuízo cognitivo da encefalomielite autoimune experimental em camundongos C57BL/6.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2017

Nilton Barreto dos Santos

Participação dos Glicocorticoides na progressão e no prejuízo cognitivo da encefalomielite autoimune experimental em camundongos C57BL/6.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Carolina Demarchi Munhoz

Versão original

São Paulo
2017

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Barreto dos Santos , Nilton

Participação dos Glicocorticoides na progressão e
no prejuízo cognitivo da encefalomielite autoimune
experimental em camundongos C57BL/6 / Nilton

Barreto dos Santos ; orientadora Carolina Demarchi
Munhoz. -- São Paulo, 2017.

76 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Hipocampo. 2. Memória Animal. 3.
Glicocorticoides. 4. Astrócitos. 5. Esclerose
Múltipla. I. Demarchi Munhoz, Carolina ,
orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato (a): Nilton Barreto dos Santos.

Título da Tese: Participação dos Glicocorticoides na progressão e no prejuízo cognitivo da encefalomielite autoimune experimental em camundongos C57BL/6.

Orientador (a): Profa. Dra. Carolina Demarchi Munhoz.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Tese de Doutorado**, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Presidente:	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **003** nas fls. **03** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Carolina Demarchi Munhoz**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Participação dos glicocorticoides na progressão e no prejuízo cognitivo de encefalomielite autoimune experimental em camundongos C57BL/6*" do qual participam o(s) aluno(s), **Nilton Barreto dos Santos, Leonardo Santana Novaes, Dielly Catrina Favacho Lopes, Érica de Almeida Duque**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **26.03.2013, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 26 de março de 2013.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

AGRADECIMENTOS

Gostaria de oferecer meus sinceros agradecimentos:

À Professora Carolina Demarchi Munhoz pela oportunidade oferecida em seu laboratório, pelo suporte científico, pelo apoio profissional e pela amizade.

A todos os Professores e companheiros de classe da Universidade Federal do Pará pela dedicada formação dos alunos do curso de Ciências Biomédicas, em especial ao Professor Edmar da Costa Tavares.

Ao Professor Cristóforo Scavone e a todos os colegas do Laboratório de Neurofarmacologia Molecular pela colaboração científica e apoio técnico.

À Professora Soráia Kátia Pereira e ao Marcelo Nicolás Muscará e colegas de Laboratório pela colaboração científica e apoio técnico.

À Professora Tânia Araújo Viel e ao Alexandre Basso pelas indicações dadas no exame de qualificação.

À Guiomar, Simone e Aninha pelo suporte técnico oferecido.

Aos amigos de laboratório Leonardo, Juliano, Dielly, Jennifer, Érica, Gabriel, Marília, Guilherme, Letícia, Fernando e Rodrigo pelas discussões científicas no ambiente de trabalho.

À minha mãe, meu pai, irmãs e tios pelo amor e dedicação.

Aos amigos Diego, Jonaya, Érica, Jesus, Josemar, Paulo, Marina e Raquel pelo aprendizado diário.

À minha esposa pelo carinho, apoio, amor, compreensão, conselhos, opiniões, críticas, e, sobretudo, por percorrer muitos caminhos ao meu lado.

Agradeço ao CNPQ e a FAPESP pelo apoio financeiro. Número do processo - 160570/2012-3.

RESUMO

DOS SANTOS, N. B. **Participação dos Glicocorticoides na progressão e no prejuízo cognitivo da encefalomielite autoimune experimental em camundongos C57BL/6**. 2017. 59 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A esclerose múltipla (EM) é uma doença neurodegenerativa autoimune, caracterizada por desmielinização no Sistema Nervoso Central (SNC). A liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias como IL-1, IL-17, IL-6 e IL-10 e IFN- γ pelas células do sistema imune, desempenham um papel crucial na modulação da doença. Além disso, a participação das células do sistema imune e da glia (microglia e astrócitos) contribuem de forma decisiva para o agravamento da EAE. Este trabalho objetiva mostrar a influência do glicocorticoide sintético, dexametasona, na progressão da doença e no aparecimento de déficits cognitivos decorrentes da mesma. Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6, fêmeas, divididos em 4 grupos (CONT, DEX, EAE, EAE+DEX) imunizadas com MOG e *Bordetella Pertussis* acrescida de BGC, diluídos em CFA (*Complete Freund Adjuvant*) e tratados com dexametasona (50mg/kg). No período assintomático (3º ao 8º dia pós imunização) e após 25 dias da imunização, os animais foram submetidos a testes comportamentais de Randall-Selito (para avaliação de dor) e Rotarod (para avaliação da função motora) além de campo aberto e labirinto em cruz elevado (para avaliação da função locomotora e ansiedade) e reconhecimento de objetos (para avaliação da função cognitiva), respectivamente, e eutanasiados no 26º dia. Os animais tratados com dexametasona (EAE+DEX) apresentaram diminuição do escore clínico em relação ao grupo EAE e apresentaram comportamento do tipo ansioso. Entretanto, o tratamento com DEX promoveu diminuição da memória de trabalho nestes animais. Além disso, o grupo EAE+DEX apresentou diminuição nos níveis de IL-10 após 26 dias. Houve, por fim, diminuição da translocação da subunidade P65 do fator de transcrição NFkB na medula, com aumento da ligação de NFkB e diminuição de CREB no hipocampo. Ainda, houve aumento do número e alteração na morfologia de astrócitos no hipocampo do grupo EAE+DEX no 26º dia. Estes dados sugerem que, embora a dexametasona melhore os sinais clínicos, a mesma diminui a capacidade cognitiva e de memória, aumenta o número e reatividade astrocitária e diminui os níveis de citocinas anti-inflamatórias na EAE.

Palavras-chave: Hipocampo. Memória Animal. Glicocorticoides. Astrócitos. Esclerose Múltipla.

ABSTRACT

DOS SANTOS, N. B. **Glucocorticoid involvement in the progression and cognitive impairment of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice.** 2017. 59 p. Ph. D. Thesis (Pharmacology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Multiple sclerosis (MS) is a neurodegenerative autoimmune disease characterized by demyelination and neuroinflammation in the central nervous system (CNS). The glial cells (microglia and astrocytes) appear to contribute decisively to the worsening of MS. Glucocorticoids (GCs) are largely used in MS treatment, however, there is growing literature suggesting that GCs are not always anti-inflammatory. To characterize the pathophysiological profile in the brain of C57BL/6 female mice with EAE after treatment with glucocorticoids, evaluating the development and/or worsening of cognitive deficits that occurs in this disease. In this study, we used female C57BL/6 mice with or without Acute Experimental Encephalomyelitis (EAE) and/or Dexamethasone (DEX 50 mg/kg) or saline in the day of immunization. The daily clinical scores were analyzed, and at 8 and 26 days after immunization, were performed plus maze and Randal (before score starts) and open field and object recognize tests (in 8th and 26th day) to see anxiety, pain, locomotor and memory deficits respectively. After, the animals were perfused with 4% PFA or decapitated for the brain and spinal cord Western Blot, immunohistochemistry and ELISA analysis. We show that DEX group has reached lower score evolution and peak compared to EAE group. In other hand, EAE and EAE+DEX groups show anxiety behavior and memory loss but not locomotors deficits (8th day after immunization). After recovery (26th day) EAE+DEX group showed lower discrimination rate, in object recognize, than control group. EAE and EAE+DEX exhibit GR and P65 translocation increase in hippocampus compare to Control and DEX group. Conversely, EAE+DEX exhibited gliosis with CREB activation, FOS-B and EGR-1 decreases; ERK and NFkB activation increase in hippocampus. In summary, our results showed that glucocorticoids treatment, indeed, diminished EAE symptoms however increase gliosis and behavioral disrupts (anxiety and work memory) suggesting a dual glucocorticoids function in inflammatory diseases.

Keywords: Hippocampus. Animal memory. Glucocorticoids. Astrocytes. Multiple Sclerosis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
AVE	Acidente Vascular Encefálico
AP-1	Proteína Ativadora 1
ATP	Adenosina Tri-fosfato
BHE	Barreira Hemato-Encefálica
CA	Corno de Amón
CAA	Células Apresentadoras de Antígenos
CDs	<i>Cluster Differentiations</i>
CIS	Síndrome Clínica Isolada
EAE	Encefalomielite autoimune experimental
EM	Esclerose Múltipla
ERK1/2	Quinase Reguladora de Sinal Extracelular
ERRO	Espécie Reativa de Oxigênio
FoxP3	<i>Forkhead Box P3</i>
GC	Glicocorticoide
GFAP	Proteína Glial Fibrilar Ácida
GD	Giro Denteado
GPCRs	Receptores acoplados a proteína G
GR	Receptor de Glicocorticoide
GREs	Elementos Responsivos a Glicocorticoides
HPA	Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
HSP	Proteína de Choque Térmico
ICAM	Molécula de Adesão Intercelular
IFN- γ	Interferon Gama
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacarídeo
LTD	Depressão de longa duração
LTP	Potenciação de Longa Duração
MOG	Micoproteína da Mielina de Oligodendrócitos
NFkB	Fator Nuclear Kappa B
OMS	Organização Mundial da Saúde
NO	Óxido Nítrico

PMB	Proteína Mielínica Básica
LTP	Potenciação de Longa Duração
MR	Receptor de Mineralocorticoides
P2X ₇ e P2X ₄	Receptores Purinérgicos Ionotrópicos
RIS	Síndrome Radiologicamente Isolada
RNA _m	RNA mensageiro
SNC	Sistema Nervoso Central
TGF-β	Fator de Crescimento Transformador Beta
TLRs	Receptores do Tipo Toll
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa
VLA-4	<i>Very Late Antigen-4</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Delineamento Experimental	45
Figura 2 - Avaliação do escore clínico através do tempo	46
Figura 3 - Quantificação dos níveis de corticosterona sérica após administração de DEX.....	47
Figura 4 - Peso em gramas do baço (A) e linfonodo (B) divididos pelo peso corporal	49
Figura 5 - Tempo de permanência e número de entradas nos braços abertos no labirinto em cruz elevado	51
Figura 6 - Tempo de permanência e número de entradas na região central do Campo Aberto no 4º d.p.i.	52
Figura 7 - Tempo de permanência e número de entradas na região central do Campo Aberto no 8º d.p.i.	54
Figura 8 - Tempo em segundos (s) para a queda dos animais expostos ao teste do rotarod (A)	56
Figura 9 - Análise de memória neutra por teste de Reconhecimento de Objetos (RO) em diferentes tempos, 8º e 26º d.p.i.	56
Figura 10 - Análise de memória contextual de medo 24 horas após choque, no 26º d.p.i.	58

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Esclerose múltipla.....	15
1.2	Participação das células do infiltrado inflamatório na EAE	17
1.3	Participação dos astrócitos e microglia na Esclerose Múltipla	19
1.4	Sintomas não motores da Esclerose Múltipla	22
1.5	Efeitos dos glicocorticoides sobre o SNC na EAE.....	23
2	JUSTIFICATIVA.....	28
3	OBJETIVOS.....	30
3.1	Geral	30
3.2	Específicos	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1	Experimentos in vivo	31
4.1.1	<i>Animais.....</i>	31
4.1.2	<i>Indução a EAE.....</i>	31
4.1.3	<i>Tratamento com Dexametasona</i>	31
4.1.4	<i>Testes comportamentais</i>	32
4.1.4.1	TESTE DE RANDALL-SELITTO (TESTE PARA A AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DOLOROSA).....	32
4.1.4.2	ROTAROD	32
4.1.4.3	TESTE DE CAMPO ABERTO	33
4.1.4.4	TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS	33
4.1.4.5	TESTE DE LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	33
4.1.4.6	TESTE MEMÓRIA AVERSIVA CONTEXTUAL - EXTINÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO AO CONTEXTO (EMM)	34
4.1.5	<i>Eutanásia</i>	35
4.2	Experimentos in vitro.....	36
4.2.1	<i>Animais.....</i>	36
4.2.2	<i>Culturas primárias enriquecidas de astrócitos.....</i>	36
4.2.3	<i>Tratamento das culturas primárias com DEX e IL-17.....</i>	37
4.2.4	<i>Viabilidade celular</i>	37
4.3	Análises moleculares e bioquímicas	38
4.3.1	<i>Análise da concentração de corticosterona sérica</i>	38
4.3.2	<i>Imuno-histoquímica para GFAP, IBA-1, cFos e ΔFosB</i>	38

4.3.3	<i>Imunofluorescência para Neu-N e GR, p65 e GFAP.....</i>	39
4.3.4	<i>Coloração por hematoxilina / eosina</i>	40
4.3.5	<i>Extração de Proteínas Nucleares e Citosólicas.....</i>	40
4.3.6	<i>Determinação da concentração de proteínas.....</i>	41
4.3.7	<i>Análise das citocinas</i>	41
4.3.8	<i>Determinação da expressão proteica do receptor de glicocorticoides (GR), da subunidade p65 do fator de transcrição NFkB, de CREB, ERK, EGR-1, de TNFα e caspase-1 por ensaio de Western Blot.....</i>	41
4.3.9	<i>Remoção dos anticorpos (Stripping) para a reutilização das membranas de Western blot</i>	42
4.3.10	<i>Ensaio de Retardo da Mobilidade Eletroforética em gel de poliacrilamida (EMSA).....</i>	43
4.3.10.1	MARCAÇÃO DA SONDA	43
4.3.10.2	REAÇÃO DE LIGAÇÃO E CORRIDA DO GEL	43
4.4	Análise dos resultados	44
5	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	45
6	RESULTADOS.....	46
6.1	O tratamento com Dexametasona no dia da imunização reduz o desenvolvimento dos sintomas da doença.	46
6.2	Dex modula a corticosterona sérica em animais com EAE	47
6.3	Dex aumenta o peso do baço e linfonodo em animais com EAE no 26 d.p.i.	49
6.4	EAE promove comportamento do tipo ansioso em teste de Labirinto em Cruz Elevado.....	50
6.5	EAE promove comportamento do tipo ansioso em teste de Campo Aberto.....	52
6.6	EAE não altera o equilíbrio e a sensibilidade dolorosa até o 8º dia pós-imunização.	56
6.7	Dexametasona não protege contra a diminuição na memória de longa duração em animais com EAE.	56
6.8	Dexametasona não protege contra a diminuição na memória contextual em animais com EAE.	57
7	DISCUSSÃO	59
8	CONCLUSÃO	67

REFERÊNCIAS*	68
--------------	----

1 INTRODUÇÃO

1.1 Esclerose múltipla

A esclerose múltipla (EM) é uma doença autoimune e inflamatória crônica, caracterizada por desmielinização na substância branca, cicatrizes gliais e degeneração axonal no sistema nervoso central. É extensa a literatura que relaciona estes efeitos nas células neurais com a autoimunidade, contudo os mecanismos celulares e moleculares que provocam a ativação e diferenciação de células imunes na periferia ainda não estão completamente elucidados. Entretanto, o resultado da infiltração dessas células ao SNC compreende; a ativação de vias inflamatórias, estresse oxidativo e neurotoxicidade, provocada pela liberação excessiva e diminuição da recaptção de neurotransmissores excitatórios (CALLEGARO, 2001; FRAGOSO, 2007; LASSMANN, 2011).

A EM afeta predominantemente adultos jovens, entre 20 e 40 anos e é duas a três vezes mais comum em mulheres (Goverman, 2009; Voskuhl, Gold, 2012; Sospedra and Martin, 2005), contudo há evidências de que esta razão pode ser maior em jovens com menos de 20 anos (3,2:1) (VOSKUHL, GOLD, 2012). No mundo, a prevalência da EM é de 30 casos para cada 100.000 pessoas, sendo a Europa a região de maior prevalência (80 por 100.000). Já no Brasil, sua prevalência é de aproximadamente 10 casos para cada 100.000 pessoas (CALLEGARO et al., 2001; FERREIRA et al., 2004; FRAGOSO, 2007; SANTOS et al., 2007). Embora existam critérios de diagnóstico disponíveis para apoiar o neurologista, ao contrário de muitas doenças, não há um único teste com resultado “positivo ou negativo” de diagnóstico para EM e nenhum dos testes disponíveis são 100% conclusivos. O seu diagnóstico depende da interpretação do histórico médico do paciente e de exames clínicos como a ressonância magnética e análise do líquido cefalorraquidiano (LUBLIN et al., 2014).

A fim de melhor entender a progressão da EM e, principalmente, promover bases para estratégias terapêuticas mais eficientes, a Sociedade Nacional de Esclerose Múltipla dos Estados Unidos da América classificou a EM em quatro tipos, sendo elas: Recorrente–Remitente (RR), Progressiva Secundária (PS), Progressiva Primária (PP) e Progressiva Recorrente (PR) (Lassmann, 2010), onde a maioria dos pacientes, no início da doença, apresentam RR, caracterizada por crises agudas intercaladas por períodos de remissão (ausência de sintomas). Após 10 ou 20 anos

do início dos sintomas, a doença pode evoluir para os outros tipos, com diminuição do intervalo entre as crises e características sintomáticas diferentes. Contudo, com base no desenvolvimento de novas tecnologias de imagem e marcadores moleculares, a Síndrome Clínica Isolada (CIS) e a Síndrome radiologicamente isolada (RIS), caracterizadas por inflamação e desmielinização com fenótipos ativos ou inativos, sugerem um estágio inicial da EM preconizando o seu diagnóstico (revisado em LUBLIN et. al., 2014).

A desmielinização e posterior degeneração axonal interferem na condução dos impulsos nervosos e os sintomas mais comuns resultantes deste processo patológico, que são observados durante os surtos, incluem: dormências, formigamentos, fraqueza afetando um ou mais membros, turvação visual, diplopia, falta de coordenação motora, zumbido, vertigem, tremores, dor, distúrbios esfincterianos (incontinência) e fadiga. Entre os sintomas mais raros estão: demência, afasia, convulsões, movimentos involuntários dos membros, cefaléia e dificuldade para engolir (ROLAK, 1996).

O tratamento da doença pode ser realizado utilizando vários fármacos imunomoduladores como o interferon beta-1b, o interferon beta-1a (subcutâneo), o mitoxantrono, natalizumab e o acetato de glatirâmer. Já na fase de recidiva, esteroides como a metilprednisolona, a prednisolona e a dexametasona são bastante utilizados (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2008). Além disso, o tratamento com agonistas de receptores de esfingomielina como o Fingolimod (FTY720) têm mostrado eficácia no controle da evolução da doença, sendo bastante versátil por atuar tanto na periferia, inibindo o egresso de linfócitos TCD4⁺ ao SNC, quanto diretamente em células astrocitárias do SNC (GARRIS et al., 2013; KAPPOS et al., 2010). Contudo, estes novos fármacos possuem custo elevado devido sua produção complexa em pequena escala.

Esta heterogeneidade da fisiopatologia da EM justifica o estudo de diferentes modelos da doença em animais. Dentre estes, o modelo de EAE (encefalomielite autoimune experimental) é muito utilizado em mamíferos, roedores e primatas não humanos. Além deste, outros modelos de desmielinização provocados por vírus (Theiler vírus), desmielinização química (cuprizona, brometo de etídio ou Liolecitina) e outras proteínas (PLP) são bastante utilizados (SIMMONS et al., 2013). Na EAE, há a hipótese de que fatores ambientais promovem ativação de células T mielino-específicas que circulam normalmente na periferia no estado de

tolerância, contudo, quando ativadas, estas células adentram o sistema nervoso central (SNC) iniciando uma resposta autoimune (SIMMONS et al., 2013; STEINMAN, ZAMVIL, 2006; ZAMVIL, STEINMAN, 2003).

A imunização, na EAE, é realizada utilizando-se peptídeos derivados de mielina, tais como a glicoproteína da mielina de oligodendrócitos (MOG) ou a proteína mielínica básica (PMB), juntamente com substâncias adjuvantes como o CFA (*complete Freund's adjuvant*) e a toxina *Bordetella pertussis*. Os peptídeos serão reconhecidos pelo organismo, levando-o a produzir anticorpos contra eles, enquanto a toxina *Pertussis* aumentará a resposta inflamatória por dois mecanismos distintos: pela ativação de receptores acoplados a proteína G (GPCRs) inibitórios ou por receptores do tipo Toll (TLR4 e TLR2). Esta ativação via TLRs recruta vias das MAPK (proteínas quinases ativadas por mitógenos) que podem ativar fatores de transcrição como NFκB, aumentando a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL1β, além de promover a ativação e proliferação de células dendríticas e neutrófilos. Ainda, receptores TLR4 são essenciais para a expansão imune do tipo TH1/TH17, muito importantes para a indução da EAE (MANGMOOL, KUROSE, 2011).

Apesar das semelhanças entre as duas, na EM, o infiltrado linfocitário é majoritariamente formado por Linfócitos B células T CD8⁺ na região perivascular do encéfalo e na substância branca da medula espinhal, reconhecidas por MHC classe I, em todos os estágios da lesão e da doença (LASSMANN, 2011). Estas células, por sua vez, apresentam maior proliferação e expansão clonal (LASSMANN, 2011; SKULINA et al., 2004), sugerindo que as mesmas estão presentes nos pacientes com EM, sendo patogenicamente acionadas por um antígeno específico. Por outro lado, nos modelos de EAE, a inflamação é mediada principalmente por células T CD4⁺, reconhecidas por MHC classe II, as quais põem secretam IFN-γ, IL-2 e TNF-α, que são características do subtipo TH1 e IL-17, característica do subtipo TH17 (CUA et al., 2003; HOHLFELD, 2004).

1.2 Participação das células do infiltrado inflamatório na EAE

O acesso ao SNC por células circulantes é controlado pela barreira hematoencefálica (BHE), que pode ser ultrapassada por células T mielino-específicas ativadas na periferia e reativadas por células apresentadoras de antígenos (CAA) no SNC. As células do endotélio possuem proteínas especializadas, as junções

ocludentes (tight junctions), que fazem contato célula-célula impedindo a difusão livre de moléculas solúveis em água através da BHE. Essa entrada no SNC apenas é possível porque as células do sistema imune, em especial os linfócitos T CD4⁺, expressam moléculas de adesão celular LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen 1, α L β 2-integrin: CD11a, CD18) e VLA-4 (very late antigen-4, α 4 β 1-integrin: CD49d, CD29), que se ligam a receptores das células do endotélio, VCAM E ICAM. A modulação da expressão desses receptores ou de seus ligantes promove uma mudança na permeabilidade da BHE, alterando a evolução da EAE (ABADIER et al., 2015). Ainda, as células da glia expressam receptores de quimiocinas (CCR2, CCR5, CCR6, CX3CR2, CXCR3, CX3CR1 CXCR4, CXCL8) e integrinas, que auxiliam a passagem das células imunes através da BHE (RANSOHOFF et. al., 2003).

Citocinas como TGF- β , IL-6 ou IL-21, IL-23 e fatores de transcrição (STAT3, ROR γ mat, and ROR α) estão envolvidos no desenvolvimento e diferenciação dos linfócitos TH-17. Após a diferenciação, as células TH17 secretam citocinas pró-inflamatórias, como IL-17A e IL-17F e IL-22 (KORN et al., 2009).

A liberação de IL-17 mostrou-se importante, principalmente na manutenção dos sintomas e na coordenação local da inflamação no cérebro de animais com EAE. Estudos anteriores sugerem o papel pró-inflamatório da IL-17 na EAE. Cai e colaboradores em 2016, mostraram que animais com EAE apresentam maior expressão do RNA mensageiro (RNAm) da IL-17 no cérebro no 18º dia pós-imunização do que na medula espinhal. Além disso, estes animais mostraram aumento na expressão de RNAm da IL-21, citocina importante para a diferenciação de linfócitos T CD4 em linfócitos TH17 nos linfonodos durante todo período de doença. Em contraste, citocinas como IL-1 β e INF- γ estão intimamente relacionadas com a indução e início dos sintomas da EAE, estando presentes em maior concentração na medula espinhal, mostrando como diferentes citocinas podem contribuir de formas distintas para a gravidade e manutenção dos sintomas na EAE (CAI et. al., 2016; INOUE et. al., 2012). Outro agente indutor da inflamação, a citocina pró-inflamatória IFN- γ , que é secretada por células Th1 ativadas e células natural killers (NK), está presente somente no SNC durante a inflamação quando as células imunes atravessam a barreira encefálica e entram no SNC. Na inflamação da EAE e EM, o mesmo está presente em níveis elevados (FARRAR, SCHREIBER, 1993; RENNO et al., 1998; SETHNA, LAMPSON, 1991; SIMMONS, WILLENBORG,

1990). Além disso, o IFN- γ apresenta-se como importante estimulador da expressão de MHCII nas células apresentadoras de antígenos na periferia e pelas células residentes do SNC, incluindo as células microgliais e astrocíticas. Diversos estudos sugerem que esta fase patogênica é conduzida por linfócitos Th1 (CAI et al., 2016; ZANMVIL et al., 2003).

IL-1 β , IL-6, IL-23 e TNF- α , liberados majoritariamente por macrófagos e células dendríticas, desempenham papel importante na inflamação do SNC, agindo diretamente sobre a ativação microglial e astrocitária (FERRARI et al., 2004), alterando a expressão de quimiocinas e de moléculas de adesão, ou indiretamente promovendo a diferenciação de linfócitos T CD4+ *naïve* em Th17. Além disso, essas citocinas estão significativamente elevadas, no encéfalo, no início dos sintomas clínicos da EAE (MURPHY et al., 2010).

Na EAE, as células T CD8+ parecem estar associadas à indução da doença, entretanto alguns estudos de EAE em camundongos CD8-deficientes sugerem o papel protetor destas células (JIANG et al., 1992; KOH et al., 1992). Contudo, poucos modelos estudam o papel das células T CD8+ juntamente com as células T CD4+, visto que estas últimas possuem participação relevante na evolução da patologia (ANDERSON et al., 2012).

Em contraste, as células T reguladoras (Treg) liberam, principalmente, interleucina 10 (IL-10), as quais são reguladoras eficientes da inflamação e autoimunidade. A IL-10, uma potente citocina anti-inflamatória, “antagoniza” a resposta Th1, inibindo a produção de INF- γ e inibindo a apresentação de antígenos (AWASTHI et al., 2007; BATTAGLIA et al., 2006). Curiosamente, os níveis de IL-10 estão aumentados em animais com EAE no pico da doença. Provavelmente, esse fenômeno se deve a uma tentativa de proteção do SNC frente ao insulto inflamatório generalizado.

1.3 Participação dos astrócitos e microglia na Esclerose Múltipla

A inflamação é um sintoma comum em diversas patologias, sendo muitas vezes mediada por células do sistema imune, através da liberação de citocinas, como visto acima. No SNC, a inflamação envolve células da glia (microglia e astrócitos), as quais contribuem para o dano neuronal. Quando ativadas, essas células promovem mudanças na morfologia e fisiologia local, acompanhadas da

liberação de mediadores inflamatórios e outros fatores bioativos (CANELLA, RAINE, 2004; DONG, BENVENISTE, 2001; STREIT et al., 1999).

Na EM e na EAE, os principais alvos celulares são os oligodendrócitos, os quais são responsáveis pela produção da bainha de mielina ao redor dos axônios. Sabe-se que nessas patologias, a mielina é atacada por uma reação autoimune e que os principais mediadores da persistência e potencialização da inflamação e da desmielinização são os astrócitos e a microglia (HÖVELMEYER et al., 2005).

As células microgliais são consideradas os macrófagos residentes do SNC, onde as mesmas protegem o microambiente, especialmente quando a função neuronal é ameaçada (KREUTZBERG, 1996). Mediante ativação, a microglia pode proliferar secretar citocinas, quimiocinas, óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio, além de expressar MHCII aumentando a apresentação de antígenos (BIBER et al., 2007; PIEHL et al., 2001). Frank et al., (2010), observaram que na exposição ao LPS, as células microgliais diminuem a expressão de MHC classe II, TLR-4, IL-1 β e TNF- α , na tentativa de controlar a resposta local e poupar os neurônios de maiores danos. Neste contexto, os TLRs e outros receptores expressos pela microglia são importantes para o início da resposta inflamatória, que em seguida é amplificada pelos astrócitos. A partir disso, vias de transdução de sinal ativam os fatores de transcrição NF κ B e AP-1, os quais produzem moléculas efetoras e amplificadoras, como citocinas (e.g., TNF- α , IL-1 β , e IL-6), espécie reativas de oxigênio (ERO) e óxido nítrico (NO). Muitos desses fatores podem gerar neurotoxicidade, levando a ativação de vias de caspases, produção de citocinas pró-inflamatórias e apoptose, participando da patogênese de diversas doenças neurodegenerativas (BIBER et al., 2007; PEREZ-NIEVAS et al., 2007; SAIJO, GLASS, 2011).

Os astrócitos, por sua vez, produzem moléculas da matriz extracelular que são componentes de suporte no SNC. Em geral, eles mantêm a homeostase iônica, produzem fatores neurotróficos, liberam peptídeos e controlam os níveis de neurotransmissores (BEZZI, VOLTERRA, 2001; HAYDON, 2001). Essas células, quando ativadas por um estímulo inflamatório, proliferaram e migram para o foco da lesão, formando uma extensa “cicatriz” ao redor. Atualmente, sabe-se que os astrócitos também realizam funções imunes como a expressão de moléculas de MHC classe II *in vitro*, além de participarem do fenótipo regulatório das células T e

apresentarem habilidade para induzir a apoptose nestas células (ALOISI et al., 2001; PIEHL et al., 2001).

Em lesões ativas na EM, há presença de astrócitos protoplasmáticos com maior expressão de GFAP e mudança morfológica específica, os quais apresentam grande interação com os oligodendrócitos. A perda de prolongamentos e consequente mudança conformacional dos astrócitos na EM pode estar relacionada à diminuição de aquaporina 4, transportador de aminoácido excitatório 2 (EAAT-2) e conexinas (ver revisão, LASSMANN, 2014).

Como elementos da resposta imune inata, os astrócitos são capazes de reconhecer moléculas que desequilibram a homeostase do SNC através de receptores específicos. A produção exacerbada de moléculas de ATP pode mediar a morte celular através de sua ligação a receptores purinérgicos ionotrópicos (P2X₇ e P2X₄) após diversas injúrias como acidentes vasculares encefálicos (AVEs), por exemplo. Concomitantemente a essa liberação de ATP, glutamato e íons potássio (K⁺) também podem ser liberados aumentando a excitotoxicidade e ativando complexos proteicos (inflamossomos) que culminarão em apoptose. Neste sentido os astrócitos parecem orquestrar a morte celular em eventos de inflamação aguda e crônica, já que apresentam alta densidade de canais de Panexina-1, que são primariamente ativados por K⁺ e aumentam a efluxo de ATP para o espaço extracelular (JACKSON et al., 2014).

Similarmente, na EAE a diminuição de conexinas impede a interação de astrócitos e oligodendrócitos, além da perda do transportador EAAT-2, que culmina no aumento considerável da excitotoxicidade. Além disso, alguns estudos mostraram grande quantidade de DNA oxidado em astrócitos, evidenciando como o estresse oxidativo contribui para a evolução e manutenção da doença, apesar destas células parecerem mais resistentes do que oligodendrócitos e neurônios (HINSON et al., 2008; MARINGIER et al., 2010).

Algumas substâncias como lipopolissacarídeo (LPS) e IFN- γ são utilizadas para induzir uma resposta inflamatória nas células microgliais e astrocitárias, fornecendo mais informações do envolvimento dessas células na neuroinflamação encontrada na EM e na EAE. O LPS é um potente agente inflamatório que é derivado da parede celular das bactérias Gram negativas, que se liga ao receptor Toll-like 4 (TLR-4), o qual é expresso na microglia, células endoteliais e células dendríticas, e sua ativação está relacionada à produção de moléculas pró-

inflamatórias como espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio, citocinas e quimiocinas (GLASS, 2010). No estudo da EAE, os TLRs são importantes devido sua expressão na microglia, atuando na diferenciação e estimulação das células T, que como já descrito acima, são importantes efetoras no SNC (ZHANG, GHOSH, 2001).

1.4 Sintomas não motores da Esclerose Múltipla

A EM é caracterizada por sintomas motores e sensoriais, no entanto outros déficits podem ser encontrados nesta patologia. Alguns distúrbios sensoriais, visuais, intestinais e urinários e também sintomas neuropsiquiátricos prevalecem na EM. A depressão, por exemplo, é bem mais comum na EM do que em outras condições neurológicas crônicas (PERUGA et al., 2011). Estudos prévios têm mostrado que os pacientes com EM possuem 50% mais chances de apresentar sintomas depressivos (CHWASTIAK, 2002). Apesar da EM ser inicialmente caracterizada por desmielinização e lesões na substância branca, diversos estudos *pós-mortem* e experimentais mostraram lesões na substância cinzenta com gliose e morte neuronal (ver CHANG et al., 2008).

Os prejuízos cognitivos causados pela EM têm sido pouco estudados, no entanto, evidências nos últimos 20 anos sugerem 70% de prevalência quando testes sensíveis são aplicados (AMATO et al., 2006). Algumas dessas disfunções manifestam-se através de déficits na memória recente, atenção, velocidade de raciocínio, funções executivas e percepção visuo-espacial (CHIARAVALLLOTI, DELUCA, 2008). Disfunções cognitivas possuem importantes implicações clínicas e podem ser mais prejudiciais aos pacientes do que as restrições motoras (AMATO et al., 2006). Estudos recentes mostraram que animais com EAE apresentaram aumento nos sintomas depressivos e de ansiedade. Estas mudanças comportamentais podem estar relacionadas com a neuroinflamação peri-hipocampal, com aumento da expressão de TNF- α , perda neuronal e alterações em neurotransmissores monoaminérgicos (PERUGA et al., 2011).

Estudos recentes mostraram que animais com EAE apresentam disfunções tanto na LTP (potenciação de longa duração, do inglês, *long term potentiation*) quanto na LTD (depressão de longa duração, do inglês, *long term depression*), ambas importantes nos processos de consolidação de memórias neutras e aversivas (para revisão, FILIPPO et al., 2016). Filippo e colaboradores (2016), mostraram que

animais com EAE na fase de remissão da doença, apresentam diminuição na LTP, produzida pelo potencial excitatório pós-sináptico, em comparação com animais controle. Além disso, estes efeitos sobre a LTP acompanhados ao comprometimento da memória espacial parecem ser dependentes do aumento da ativação microglial e liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , e mediados pela atividade da enzima NADPH oxidase.

O hipocampo é um órgão envolvido no aprendizado e na consolidação de memórias episódica, declarativa, espacial e contextual, além de estabelecer conexões importantes com outras áreas vizinhas, sendo muito sensível aos danos causados por distúrbios neurológicos como a epilepsia e doenças metabólicas, como a diabetes (MAGARINOS, MCEWEN, 2000; MCEWEN, MAGARINOS, 2001). Por se tratar de um órgão peri-ventricular, o hipocampo apresenta grande neurogênese, principalmente no giro denteado (GD) e na região CA3. Diversos modelos experimentais de AVC isquêmico, doença de Alzheimer, depressão e EAE apresentam diminuição na neurogênese hipocampal, mostrando como este órgão é sensível a estímulos inflamatórios e peça chave para o estudo de comorbidades (KOO et al., 2009; MAGALON et al., 2007; ZHAO et al., 2005). Magalon e colaboradores, (2007), por exemplo, mostraram que o ambiente enriquecido diminui a progressão da EAE em camundongos, além de aumentar a neurogênese na zona subventricular.

Outro estudo recente mostrou que animais com EAE apresentaram sintomas do tipo ansioso acompanhados de mudanças em diferentes tipos de memória, antes do início dos sintomas. Não obstante, esses achados foram acompanhados de ativação microglial e aumento de RNAm de IL1 β e TNF α , no hipotálamo desses animais (ACHARJEE et al., 2013). Estes estudos mostram a importância do hipocampo e de suas conexões com outras regiões encefálicas como amígdala, córtex pré-frontal, córtex entorrinal e hipotálamo nesta patologia.

1.5 Efeitos dos glicocorticoides sobre o SNC na EAE.

Os glicocorticoides (GC) liberados pela suprarrenal (cortisol e corticosterona em humanos e roedores, respectivamente), são conhecidos por suas propriedades anti-inflamatórias, crescimento ósseo reprodução, cognição, comportamento e proliferação e sobrevivência celular. Os GCs podem interagir com proteínas, receptores e canais de membrana, bem como no citosol, ligando-se a diferentes

receptores de mineralocorticoides (MR) e glicocorticoides (GR), os quais apresentam-se ligados às chaperonas HSP90, HSP70 e p23 em condições basais (DALMANN, 2005). Ao ligar-se aos seus receptores, os GCs formam dímeros e migram para o núcleo celular, gerando seus efeitos transcricionais clássicos, através de ligação direta aos elementos responsivos aos glicocorticoides (GREs), ou por composição (*thetering*), ligando-se diretamente a outros fatores de transcrição e/ou interagindo com outros fatores de transcrição vizinhos (via canônica) (CRUZ-TOPETE, CIDLOWSKI, 2014; KARST et al., 2005; SORRELLS et al., 2009).

Os glicocorticoides são largamente responsivos aos danos encefálicos após a exposição ao estresse e estímulos inflamatórios por diferentes vias, como: a inibição da captação de glicose pelos neurônios (VIRGIN et al., 1991), a excitotoxicidade provocada por aminoácidos excitatórios (GOODMAN et al., 1996) e a inibição da captação dos mesmos (VIRGIN et al., 1991).

Os efeitos gerados pelos GCs variam de acordo com o tempo de exposição, dose e fármaco utilizado. Bosscher e colaboradores (2003) mostraram que a exposição crônica aos GCs diminui a circulação de leucócitos e liberação de citocinas pró-inflamatórias como (IL-1 β e TNF- α), além de diminuir as interações entre GR e NF κ B no núcleo. Além disso, Lüher e Reichardt, (2009) mostraram que GCs diminuem a expressão de FoxP3 (marcador de Treg) em animais com EAE, evidenciando como a sua ação pode ser controversa.

A hipercortisolemia pode contribuir para os processos neurodegenerativos e disfunções cognitivas similares às apresentadas na atrofia hipocampal na maioria das desordens depressivas e doenças degenerativas do cérebro (MCEWEN, 2002). Pacientes com EM, em tratamento com corticoides no período de surto, demonstram piora transitória das funções cognitivas (BRUNNER et al., 2005). Interessantemente, a desregulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) é frequente na EM, com aumento da atividade em aproximadamente 50% dos pacientes (HEESEN et al., 2007). Estes dados sugerem que as disfunções cognitivas na EM podem estar ligadas ao aumento da atividade do eixo HPA. Vários estudos justificam os efeitos benéficos dos GCs em roedores com EAE, nos sinais clínicos, histológicos e imunológicos da doença (DONG, 2001; HEMMER, 2002; NEUMANN, 2001). Entretanto, estes resultados são conflitantes devido à utilização de diferentes modelos de indução à EAE e diferentes GCs; e.g. metilprednisona, dexametasona e

prednisona, juntamente com diferentes doses e regimes terapêuticos; e.g. profilaxia versus terapia.

Em contraste, estudos em humanos e animais revelaram uma importante relação entre os GCs e algumas desordens cerebrais como depressão, demência e esquizofrenia (GOEL, BALE, 2009; MEYER, FELDON, 2010). Achados em modelos animais evidenciam a participação e influência dos glicocorticoides na atrofia neuronal e diminuição da densidade de células gliais (SOUSA et al., 2008). Yu e colaboradores, em 2011, mostraram que os GCs podem atuar na diminuição astrocitária e neuronal após o estresse, e que esta diminuição não está relacionada a apoptose, mas sim aos mecanismos reguladores dos astrócitos mediante a presença dos GCs. Além disso, Koo e colaboradores, em 2009, mostraram que altas concentrações de corticosterona aumentam a translocação e ativação de NF κ B, aumentando a liberação de IL1 β , que, por conseguinte, promove diminuição da neurogênese em cultura de células e no hipocampo de ratos.

Os GCs sintéticos (prednisona, metilprednisona, dexametasona) são imunossupressores potentes e largamente utilizados em doenças alérgicas, bem como no tratamento na fase aguda da EM. Contudo, os dados encontrados sobre a sua eficácia, como agentes modificadores da EM, são controversos (SORREIIS et al., 2009; WUST et al., 2012; YU et al., 2011). Sorensen e colaboradores (2009) mostraram que o tratamento agudo com metilprednisona, aditada à terapia com IFN- β , pode ajudar no tratamento da EM, alterando o curso normal da doença. Em contraste, células T obtidas do baço de camundongos durante a EAE adquiriram resistência à apoptose induzida por GCs. Esta regulação parece estar ligada à diminuição da expressão de GR-alfa nos linfócitos T CD4+ e T CD8+, em humanos e animais (GOLD et al., 2012; SCHWEINGRUBER et al., 2012).

Em humanos, o *splicing* alternativo no exon 9 do RNAm de GR pode gerar duas isoformas altamente homólogas: GR α e GR β . Estudos anteriores têm mostrado que a isoforma GR β possui função dominante inibitória sobre GR α , suprimindo a atividade de GR α e resultando na insensibilidade aos GCs (CHARMANDARI et al., 2005; WEI et al., 2009). A proporção entre outras isoformas de GR (GR γ , GR-A e GR-P), possivelmente, está relacionada às mudanças no escore clínico em ratos com EAE, no entanto não foram encontradas diferenças entre doses baixas e altas dos corticoides usados como tratamento (CRUZ-TOPETE, CIDILOWISK, 2014; WEI et al., 2009).

Os mecanismos responsáveis pela resistência aos GCs e os fatores envolvidos ainda permanecem desconhecidos. Atualmente, tem sido bastante aceito que os receptores de GCs (GR) desempenham papel importante na resistência aos mesmos. A expressão de isoformas de GR pode mudar a sequência da exposição ao GC, ou seja, o tratamento com altas doses agudas de GCs poderia alterar a estrutura do GR e a terapia inicial com altas doses de esteroides poderia induzir um fenótipo resistente ao GC (WEI et al., 2009; WUST et al., 2012).

Como já sabido, eventos estressantes crônicos são responsáveis pelo aumento da liberação de corticoides endógenos. Por conseguinte, essa liberação pode gerar numerosos efeitos deletérios em regiões específicas do SNC, principalmente àquelas com altos níveis de GR e MR (exemplo: hipocampo e córtex), prejudicando a plasticidade sináptica e a cognição, diminuindo a neurogênese, a densidade de espinhas e atrofia dendrítica (MCEWEN, MAGARINOS, 2001; SORRELLS et al., 2009).

Em algumas patologias como na depressão, ocorre desregulação no eixo HPA prejudicando áreas vizinhas como o hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal, gerando diminuição de neurônios e astrócitos neste último. Swaab e colaboradores, (2005) sugerem que estes achados se devem à inibição do metabolismo causada pelos glicocorticoides.

A atrofia do hipocampo é comum em diversas condições como na síndrome de Cushing, caracterizada pela desregulação do eixo HPA e aumento de GCs circulantes, na doença depressiva recorrente, estresse pós-traumático e esquizofrenia. A atrofia parece estar intimamente ligada à perda de neurônios ou diminuição da neurogênese. Outras estruturas cerebrais podem apresentar atrofia, principalmente na depressão, como córtex e amígdala. Nestas regiões, a diminuição de células gliais pode contribuir de forma substancial para a atrofia (MCEWEN, MAGARINOS, 2001). Neste contexto, pode-se atribuir a participação dos GCs na atrofia de diversas regiões encefálicas, já que este hormônio está aumentado em várias patologias.

Apesar dos mecanismos causais destas enfermidades não estarem bem descritos, os GCs parecem contribuir de forma relevante para o seu agravamento. Estudos anteriores mostraram que o estresse agudo por 24 horas (JHONSON et al., 2002) ou crônico imprevisível (MUNHOZ et al., 2006) seguido da administração de LPS pode aumentar os níveis plasmáticos de IL-6, TNF- α e IL-1 β . Além disso, em

estudo semelhante, a administração de CORT previamente a de LPS potencializa a expressão de citocinas pró-inflamatórias no hipocampo (FRANK et al., 2010) e córtex frontal de ratos (MUNHOZ et al., 2010). Estes dados sugerem que, em meio a um estímulo ou substância estressora (LPS), os GCs podem potencializar a resposta inflamatória.

Os efeitos pró-inflamatórios dos GCs no SNC podem ser mediados principalmente através da ativação microglial. Em estudos prévios, a microglia de ratos pré-tratados com corticosterona (CORT) e desafiada com LPS, apresentou regulação positiva de MHC II e TLR-4 e níveis maiores de IL-1 β e TNF- α do que a microglia de ratos controle (FRANK et al., 2010). Neste contexto, os efeitos dos GCs são relevantes visto que o estresse sub-agudo induz proliferação microglial dependente de GR (NAIR, MATTSON, 2007) e a exposição à CORT pode ocasionar a liberação de citocinas pela microglia *ex vivo* (FRANK et al., 2006; SORRELLS et al., 2009).

Ainda, os GCs podem agir de forma não genômica (não canônica), através de ligações cruzadas com outras vias de sinalização e fatores de transcrição (BOSSCHER et al., 2003). Altos níveis de CORT podem antagonizar a sinalização de MAPK pela indução da MAPK fosfatase-1 (MKP-1), a qual reduz a ativação de NF κ B. MKP-1 ativada por estresse, soro ou fatores de crescimento, pode atuar desfosforilando e inativando MAP quinases como JNK, p38 e ERK1/2 (CLARK, LASA, 2003; SORRELLS et al., 2009). Um estímulo pró-inflamatório como LPS pode induzir a expressão de MKP-1, criando um *feedback* negativo, regulando negativamente a produção TNF- α , IL1- β e IL-6 (ZHAO et al., 2005). Estes mecanismos são importantes para entender como e por quais vias os GCs atuam em eventos inflamatórios no SNC. Estudos de nosso laboratório mostraram que o tratamento prévio com doses moderadas de corticosterona seguido de LPS é capaz de reduzir a expressão do RNAm dessa fosfatase, indicando uma incapacidade deste hormônio em aumentar a resposta anti-inflamatória (MUNHOZ et al., 2010).

Tendo em vista a influência dos GCs em diversas doenças e que este é muito utilizado nas fases de crise da EM, torna-se interessante o estudo dos efeitos destes esteroides sobre as populações celulares residentes e infiltrantes no SNC e como essas interações modificadas pelos influenciam em sintomas cognitivos presentes na EAE, evidenciando de que maneira os GCs modulam os fenótipos celulares e quais são as vias de sinalização envolvidas.

2 JUSTIFICATIVA

A EM é uma doença neurológica de prevalência importante em todo o mundo, atingindo principalmente a população mais ativa da sociedade (20 a 40 anos). Após 10 anos da confirmação do diagnóstico, estes pacientes poderão estar inaptos a realizar suas atividades cotidianas, visto que estes sintomas são decorrentes de lesões neurológicas motoras e cognitivas importantes. Dentre os mecanismos de patogenicidade da doença é possível destacar a inflamação como a principal causa das lesões desmielinizantes encontradas na EM.

No tratamento da EM são utilizados diversos fármacos, com atuação em diferentes sítios de ação, seja na barreira hemato-encefálica ou na ação direta sobre um tipo celular (Interferon- 1β , Mitoxantrona, acetato de glatirâmer). Por se tratar de uma doença autoimune, são utilizados muitos inibidores da ativação do sistema imune como tratamento paliativo na EM, dentre os principais fármacos utilizados nas fases agudas da doença, estão os glicocorticoides (imunossupressores clássicos). Entretanto, a utilização de GCs é controversa, já que pode provocar resistência ao medicamento e possui muitos efeitos adversos, podendo agravar alguns sintomas da EM.

Além dos sintomas motores clássicos da EM e da EAE, outros sintomas como, ansiedade, depressão e déficits cognitivos podem estar relacionados à doença, porém os mecanismos pelos quais são desencadeados ainda estão pouco elucidados.

A desregulação do eixo HPA acrescida da utilização de GCs na fase aguda da doença podem ser importantes no aparecimento dos déficits cognitivos, mesmo sabendo da dificuldade dos GCs sintéticos em atravessar a barreira hemato-encefálica, sugerindo que a ação periférica destes fármacos pode gerar efeitos importantes no SNC.

O envolvimento das células do sistema imune periférico e residente no SNC (astrócitos e microglia) na neuroinflamação na EM é de suma importância, como já descrito, principalmente por essas células serem as principais mediadoras e efetoras na progressão da doença. Tais células podem ser moduladas pelos GCs alterando o decurso normal da doença.

Por fim, o estudo dos GCs e sua ação nas células imunes e gliais, pode elucidar a presença dos sintomas não motores da EM, além de trazer grandes

contribuições para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, uma vez que a neuroinflamação é primordial no longo processo que culmina na morte neuronal na EM e em outras doenças neurodegenerativas e que os GCs podem prejudicar a atividade neuronal e agravar a neurodegeneração.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Sabendo que os prejuízos cognitivos causados pela EAE são frequentes e que os glicocorticoides, fármacos utilizados no tratamento da EM, podem agravar a inflamação no SNC em diversos modelos de inflamação, este Estudo tem como objetivo geral avaliar a participação deste hormônio esteroide no desenvolvimento e/ou piora dos déficits cognitivos que ocorrem nesta patologia.

3.2 Específicos

Investigar o papel das células da glia (principalmente os astrócitos) na manutenção da inflamação e na modulação da atividade neuronal no hipocampo. Além disso, elucidar quais vias de sinalização celular estão envolvidas na comunicação entre as células do SNC, após a EAE e o tratamento com Dexametasona.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Experimentos in vivo

4.1.1 Animais

Foram utilizados 192 camundongos C57BL/6, fêmeas, adultas, entre 6 e 8 semanas e pesando entre 25 g e 30 g, provenientes do Biotério de Camundongos Isogênicos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em temperatura controlada (20-22 °C) e ciclo claro/escuro de 12 horas, com início do ciclo de claro as 7:00 horas. Foram alimentados com ração balanceada para camundongos e água *ad libitum*.

Todos os procedimentos experimentais, que incluem a imunização, perfusão e decapitação dos animais, foram aprovados e realizados de acordo com as normas da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA/ICB-USP), registrados sob o número 03, na folha 03 do livro 03 e seguiram todas as exigências descritas no Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

4.1.2 Indução a EAE

Para a indução da EAE, os animais foram imunizados por via subcutânea com 150 µg de MOG₃₅₋₅₅ emulsificados em CFA (v/v), do inglês *complete Freund's adjuvant* com um total de 400 µg de BCG (Bacillus Calmette-Guérin). Além disso, foram feitas duas administrações, na região plantar desses animais, de 200 ng de toxina de *Bordetella pertussis* 0 e 48 horas após a imunização. Os animais foram avaliados diariamente com uma escala clínica (descrita abaixo) e sofreram eutanásia no 9º, 16º e 26º dia pós-imunização (d.p.i.), que corresponde ao estágio pré-clínico, pico e a fase de recuperação da doença, respectivamente.

Os animais foram avaliados diariamente e o grau de apresentação clínica distribuído da seguinte forma: 0) sem doença; 0.5) perda do tônus de cauda; 1) fraqueza de membros posteriores; 2) hemiplegia; 3) arrastamento parcial dos membros posteriores; 4) paraplegia e 5) tetraplegia ou morte.

4.1.3 Tratamento com Dexametasona

Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais (Controle, DEX, EAE, EAE+DEX) com 18 animais em cada grupo. No dia da imunização com MOG, os

animais foram tratados com Dexametasona diluída em PBS (50 mg/kg) por via intraperitoneal (I.P.) (WURST et al., 2012).

4.1.4 Testes comportamentais

Afim relacionar os efeitos provocados pela administração de GCs na EAE com possíveis déficits cognitivos, foram realizados, antes do início dos sintomas (3º ao 9º dia pós-imunização) e no período de recuperação (25º e 26º dias pós-imunização), os seguintes testes:

4.1.4.1 TESTE DE RANDALL-SELITTO (TESTE PARA A AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DOLOROSA)

Neste teste, descrito por Randall e Selitto (1957), uma força em gramas (g) de magnitude crescentes (16 g/s) é continuamente aplicada sobre o dorso das patas posteriores do camundongo e interrompida quando o animal apresenta a “reação de retirada” do membro. Desta maneira, o limiar de dor é representado como a força (g) necessária para a indução da reação. O teste foi aplicado antes da imunização (medida inicial) e nos dias 3, 5 e 8 após a imunização. Cada animal foi submetido a três sessões diárias. Os resultados foram analisados comparando-se as médias iniciais e dos diferentes dias e entre os diferentes grupos experimentais. Estes experimentos foram realizados no Laboratório de Bioquímica e Farmacologia dos Radicais, Livres e Inflamação/Dor do Departamento de Farmacologia – ICB – USP, coordenado pela Profa. Dra. Soraia Kátia Pereira Costa.

4.1.4.2 ROTAROD

O rotarod foi utilizado para medir a habilidade locomotora e coordenação dos animais e foi realizado como descrito em Olechowsky e colaboradores (2013). Nos dias 6, 7 e 8 após a imunização, todos os animais, independente do tratamento recebido, foram expostos ao rotarod. Neste teste, os camundongos foram colocados no aparelho numa rotação fixada em 16 rpm por, no máximo, 180 segundos e a latência para a queda foi medida. Os animais foram submetidos a 5 sessões diárias e a média das latências de queda por sessão foi calculada. Estes experimentos foram realizados no Laboratório de Bioquímica e Farmacologia dos Radicais, Livres e Inflamação/Dor do Departamento de Farmacologia – ICB – USP, coordenado pela Profa. Dra. Soraia Kátia Pereira Costa.

4.1.4.3 TESTE DE CAMPO ABERTO

Este teste foi realizado no 4 d.p.i. e no 8 d.p.i. para avaliação da atividade locomotora e comportamento do tipo ansioso. Para tal, utilizou-se aparato circular (400 mm x 600 mm, diâmetro x altura), com o piso dividido em 2 compartimentos, central e periférico, e com as paredes opacas. Os animais foram colocados na periferia do aparato e submetidos à exploração do ambiente durante 5 minutos. O número de cruzamentos de quadrantes, velocidade média e velocidade máxima foram utilizados para avaliação da atividade locomotora, enquanto que o número de entradas e tempo de permanência no centro do aparato indicaram o nível de ansiedade desses animais.

4.1.4.4 TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS

Inicialmente, os animais passaram por treinamento no mesmo aparato de campo aberto durante 4 dias consecutivos no mesmo horário a partir do 4º d.p.i. No 8º d.p.i., Os animais foram colocados no campo aberto contendo dois objetos idênticos (A e B), para livre exploração, por 10 minutos. Duas e 24 horas depois do treino, para testar a memória de curta duração (MCD) e memória de longa duração (MLD) respectivamente, os animais foram colocados novamente no campo aberto por 5 minutos para exploração. Entretanto, nestes testes, o objeto B foi substituído por outro (C, para MCD e D, para MLD). Foi considerada exploração quando os animais cheiraram ou tocaram o objeto com o nariz ou com as patas dianteiras. O tempo gasto explorando cada objeto foi anotado e expresso em total de tempo de exploração computado em segundos, permitindo determinar a razão de discriminação estabelecida a partir da proporção de tempo de exploração do objeto novo em relação ao objeto familiar ($t_{\text{novo}} / t_{\text{novo}} + t_{\text{familiar}}$).

4.1.4.5 TESTE DE LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

O LCE é constituído de dois braços abertos e opostos (20 x 20 cm cada), e outros dois braços opostos do mesmo tamanho fechados por paredes laterais de 30 cm de altura. Os braços abertos e fechados cruzam-se perpendicularmente formando uma cruz, delimitada por uma pequena área central de 5 x 5 cm, seguindo as especificações de Pellow et al. (1985). O aparelho é constituído de madeira tratada com tinta fosca, suspenso a 40 cm do assoalho por um suporte central e,

durante os testes, é alocado em uma sala de experimentação com condições de luminosidade e temperatura iguais às do biotério.

No dia do experimento (8 d.p.i.), cada animal foi colocado individualmente na área central do LCE, com a cabeça voltada para um dos braços abertos, podendo explorar o aparato durante 5 minutos. Para a análise do comportamento do tipo ansioso, foram avaliados o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos, além do índice de ansiedade calculado pela fórmula $= 1 - (\% \text{ entradas braços abertos}) + (\% \text{ tempo braços abertos}) / 2$. Todo procedimento foi filmado por uma câmera de vídeo suspensa sobre o aparelho para posterior análise por meio de software Any Maze Stoelling.

4.1.4.6 TESTE MEMÓRIA AVERSIVA CONTEXTUAL - EXTINÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO AO CONTEXTO (EMM)

Para a realização do ensaio destinado à avaliação do medo condicionado ao contexto foram utilizadas duas arenas distintas: uma caixa de condicionamento e uma arena neutra (arena não pareada, NP), no caso, um aparelho de campo aberto (30 cm de diâmetro), ambas localizadas em sala de experimentação mantida em condição de temperatura igual ao do biotério de acomodação. A caixa de condicionamento (28 x 26 x 23 cm) é composta por paredes brancas, uma tampa e uma parede de acrílico transparentes e uma base formada por barras metálicas condutoras de corrente elétrica disposta de forma linear (diâmetro de 0,4 cm e espaçamento entre elas de 1,05 cm) e conectadas a um gerador de choque elétrico (Insight Equipamentos, Pesquisa e Ensino, Ribeirão Preto, SP). O campo aberto (21 x 26 x 27,5 cm) é composto por parede circular em acrílico e assoalho de madeira pretos, sem compartilhar padrões visuais com a caixa de condicionamento. No dia do treino (dia 24, conforme delineamento experimental), cada animal foi introduzido, individualmente, na caixa de condicionamento pelo período de 2 minutos, seguido do estímulo incondicionado (EI), no caso choque nas patas. O EI foi composto por uma sessão de choque (1 mA) com duração de 1 segundo. Quinze segundos após o fim do EI, os animais foram reconduzidos às suas respectivas gaiolas de acomodação. Vinte e quatro horas após o treino, dia 25, os animais foram conduzidos ao primeiro teste de extinção da memória. Os animais foram introduzidos, individualmente, na arena de condicionamento, onde permaneceram por de 10 minutos, sem a presença do EI. Esse procedimento foi repetido por mais 5 vezes totalizando, portanto, 6

sessões de testes, com o mesmo intervalo de 24 h entre eles. A parte dos animais que foi direcionada à arena NP seguiu o mesmo procedimento, sendo acondicionada na arena NP com o mesmo intervalo de 24 h, exceção feita ao último teste, quando os animais foram introduzidos na arena de condicionamento. Esse controle foi realizado para verificarmos se as eventuais alterações na porcentagem de freezing dos animais são decorrentes da passagem do tempo ou fruto da exposição à arena condicionada sem a presença do EI. Espera-se que os animais NP, no teste 6, apresente a mesma porcentagem de freezing que o animal pareado no teste 1. Todo o procedimento de treino e teste foi registrado por uma câmera de vídeo e a análise do comportamento foi realizada durante o treino (2 minutos antes do EI – pré-EI) e durante os primeiros 5 minutos de cada teste. A medida de análise de comportamento de medo foi o tempo de congelamento (freezing), definido como uma completa imobilidade do animal, com ausência de movimento de vibrissas e de farejamentos (FANSELOW e BOLLES, 1979).

Os testes comportamentais descritos nos itens 4.1.4.3 ao 4.1.4.6 foram realizados no Laboratório de Neuroquímica e Farmacologia Comportamental do Departamento de Farmacologia, ICB – USP, coordenado pela Profa. Dra. Rosana Camarini.

Os animais foram testados entre 8:00 h e 12:00 h e ao término de cada teste, o campo aberto, os objetos e os aparatos foram limpos com uma solução de álcool a 5% para minimizar a influência de pistas olfatórias.

4.1.5 Eutanásia

Metade dos animais foi perfundida por via intracardíaca com solução de paraformaldeído 4% para a utilização do tecido nos ensaios de imuno-histoquímica e imunofluorescência, enquanto que a outra metade foi submetida à eutanásia por decapitação para a dissecação do hipocampo dorsal e da medula espinhal (porção lombar) para a realização de ensaios de Western Blot e EMSA e análise de citocinas. O sangue do tronco foi recolhido para a obtenção do soro para a dosagem de corticosterona. Os tecidos retirados foram armazenados à - 80 °C e o soro foi armazenado a - 20 °C para análise *a posteriori*.

4.2 Experimentos in vitro

4.2.1 Animais

Foram utilizados camundongos neonatos da linhagem C57BL/6, entre 1 e 4 dias de idade (P1-P4), provenientes do Biotério de Camundongos Isogênicos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados e realizados de acordo com as normas da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP), registrados sob o número 03, na folha 03 do livro 03 e seguiram todas as exigências descritas no Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

4.2.2 Culturas primárias enriquecidas de astrócitos

As culturas primárias de tecido encefálico foram preparadas a partir do protocolo descrito por (HERTZ et al., 1998), com algumas modificações. Os animais sofreram eutanásia por decapitação, seguido de microdissecção do encéfalo, excluindo-se o tronco cerebral e o cerebelo, em tampão Hanks (160 mM de NaCl; 5,3 mM de KCl; 0,44 mM de KH_2PO_4 ; 0,33 mM de Na_2HPO_4 ; 4 mM de NaHCO_3 ; 5,5 mM de glicose acrescido de 1% de penicilina/estreptomicina e 0,1% de fungizona) estéril e gelado. O encéfalo isolado foi incubado por cerca de 8 minutos a 37 °C em solução de tripsina/EDTA a 0,05% (Gibco-Invitrogen) em tampão Hanks, para digestão enzimática e depois transferido para o meio de cultura (Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Gibco-Invitrogen) contendo antibióticos (penicilina/estreptomicina, Gibco-Invitrogen) acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco-Invitrogen) e 2 mM de glutamina (Amresco) e gentilmente triturado mecanicamente com o auxílio de pipeta Pasteur. As células contidas no sobrenadante foram filtradas em membrana de 70 μm e plaqueadas (1×10^5 células / cm^2) em garrafas de 75 cm^2 com meio DMEM, antibióticos, 10% SFB e 2 mM de Glutamina e mantidas a 37 °C com 5% CO_2 em atmosfera umidificada (umidade relativa do ar de 80%) na incubadora. A fim de assegurar maior uniformidade na densidade de células por poço, foi realizada a contagem do número de células antes do plaqueamento, utilizando-se o método de exclusão por Azul de Tripán.

Para a manutenção destas culturas, o meio foi substituído a cada 3 ou 4 dias. No 14º DIV, as células foram submetidas à agitação por 3 horas, 180 RPM a 37

°C e o sobrenadante foi descartado. Os astrócitos, aderidos, foram lavados duas vezes com PBS (solução salina balanceada: 135 mM de NaCl, 1,3 mM KCl, 0,5 mM KH_2PO_4 e 3,2 mM de Na_2HPO_4) e em seguida foram removidos enzimaticamente com tripsina/EDTA 0,05% por 10 a 20 minutos a 37 °C. Após centrifugação por 5 minutos a 2000 rpm em temperatura ambiente, os astrócitos foram ressuspensos em meio DMEM, antibióticos, 2 mM de glutamina e 10% de SFB tratado com carvão ativado (Fetal Bovine Serum, Charcoal Stripped, Sigma-Aldrich) e semeados em placas de cultura multi-poços a uma densidade aproximada de $1,0 \times 10^5$ células / cm^2 . Após 48 horas, as culturas enriquecidas de astrócitos foram submetidas aos nossos protocolos de tratamento descritos a seguir.

4.2.3 Tratamento das culturas primárias com DEX e IL-17

Para avaliarmos os possíveis efeitos da DEX em modelo *in vitro* de EAE, as culturas primárias foram tratadas com DEX (1 μM , 24 horas) e/ou IL-17 (10 pg / mL, 100 pg / mL, 1 ng/mL, 10 ng / mL e 100 ng/ mL, 24 horas).

4.2.4 Viabilidade celular

O ensaio de viabilidade celular foi realizado através do ensaio colorimétrico do MTT. O método é baseado na adição de solução de MTT (3-(4,5-cimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromide, 5 mg/ml) (Sigma-Aldrich) ao meio de cultura, 2-4 horas antes da leitura, para subsequente clivagem do sal de tetrazolium (cor amarelo) em cristais de formazan (coloração púrpura), por células metabolicamente ativas. Os cristais de formazan do MTT foram solubilizados pela adição de 300 μL de álcool isopropílico e quantificados por espectrofotometria no comprimento de onda de 570 nm. A absorbância resultante dos nossos experimentos representou a redução da atividade metabólica total, interpretada como redução no número de células viáveis ou vivas.

Para a análise de absorbância foi utilizado o equipamento Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader (BioTek, Winooski, VT, USA). Cada condição experimental foi apresentada em triplicatas de poços para cada experimento, resultante de 4 experimentos independentes. A viabilidade celular foi calculada como percentagem dos poços-controles e os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média.

4.3 Análises moleculares e bioquímicas

4.3.1 Análise da concentração de corticosterona sérica

Para a análise dos níveis séricos de corticosterona, utilizamos o kit *Corticosterone EIA kit* (Enzo Life Sciences, Inc, UK), de acordo com a orientação do fabricante. As amostras de soro foram diluídas 30 vezes em tampão de ensaio fornecido pelo kit para que se ajustem à faixa ótima da curva padrão.

4.3.2 Imuno-histoquímica para GFAP e Δ FosB

Para caracterização fenotípica dos encéfalos dos animais com EAE, foi realizado o ensaio de imuno-histoquímica. Para este ensaio, foram feitos, nos encéfalos anteriormente perfundidos, cortes seriados de 40 μ m em criostato semi-automático Leica (modelo 1850 UV) e armazenados em solução de PBS (solução salina balanceada: 135 mM de NaCl, 1,3 mM KCl, 0,5 mM KH_2PO_4 e 3,2 mM de Na_2HPO_4) acrescida de azida sódica (0,02%). A imuno-histoquímica do encéfalo foi realizada pelo método *free-floating* e as lavagens foram feitas com PBS 1x. Após sucessivas lavagens com PBS, os cortes foram incubados com solução de PBS acrescida de glicina (40 mM) por 5 minutos e lavados novamente com PBS. A seguir, os cortes foram incubados em solução de 1% H_2O_2 acrescida de metanol (10%), para inativação da peroxidase endógena. Em seguida foram bloqueados com soro de bloqueio (5% de soro de jumento + 0,05% Triton X-100 em PBS) durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, os cortes foram incubados com anticorpo primário diluído em soro de bloqueio e deixados overnight 4°C ao abrigo da luz. Foram utilizados os seguintes anticorpos: anti-GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*, marcador de astrócitos, 1 : 5000); e anti- Δ FosB (1 : 1000), utilizado como marcador da atividade neuronal acumulada tardia, respectivamente. Após a incubação com o anticorpo primário, os cortes foram lavados com PBS (3 vezes por 10 minutos) e incubados durante 2 horas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz com anticorpo secundário (1 : 200) diluído em PBS + 0,05% Triton X-100. Após diversas lavagens, os cortes foram então incubados em uma solução de fosfato de potássio (0,02 M) contendo um anticorpo biotinilado anti-coelho feito em cabra (Vector, Burlingame, CA; diluição 1 : 200) e triton X-100 a 0,3%. O complexo antígeno-anticorpo foi visualizado com a técnica do complexo avidina-biotina (kit Elite; Vector) e a 3,3'-diaminobenzidina (DAB) foi utilizada como cromógeno. O

produto da reação da peroxidase foi revelado utilizando o procedimento da glicose oxidase (ITOH et al., 1979).

Após montagem e secagem das lâminas, as mesmas foram imersas em bateria de álcool, em concentrações decrescentes (95%, 70% e 50%), para hidratação por 2 minutos cada. As lâminas foram imersas em solução de cresil violeta (0,03%) por 10 minutos. Em seguida, foram lavadas rapidamente com ácido acético 5% e embebidas em bateria de álcool, em concentrações crescentes (50%, 70% e 100%), para desidratação por 2 minutos cada. Por fim, foram colocadas em solução de xilol durante 3 minutos e sobrepostas com lamínulas com meio de montagem DPX. As células positivas foram observadas com auxílio de microscópio de fluorescência Nikon Eclipse 80i (Nikon Instruments Inc., NY, EUA). As imagens foram capturadas pela Nikon Digital Camera DXM 1200C e analisadas pelo software de Imagem *NIS-Elements Advanced Research 2.30* (Nikon Instruments Inc.). Foram fotografados 10 campos visuais diferentes e 3 cortes encefálicos de cada animal para amostragem.

4.3.3 *Imunofluorescência para Panexina-1 e GR, p65 e GFAP*

Para os ensaios de imunofluorescência em cultura primária de astrócitos, as células foram plaqueadas em densidade aproximada de $3,0 \times 10^4$ células / poço em placas 24-well contendo lamínulas de borosilicato com 13 mm de diâmetro recobertas com poli-L-lisina, onde foi realizado ensaio de imunofluorescência.

Os astrócitos foram marcados contra a proteína acídica fibrilar glial, uma proteína do filamento intermediário restrita aos astrócitos, com o anticorpo anti-GFAP (1 : 5.000, Sigma-Aldrich). Ainda, foram utilizados anticorpos específicos para o receptor GR (1 : 1.000, Santa Cruz Biotechnology), para a subunidade p65 do fator de transcrição NF κ B (1 : 1.000, Santa Cruz Biotechnology) e para o hemicanal específico de astrócitos Panexina (1: 1.000, Santa Cruz Biotechnology).

Após os tratamentos farmacológicos, as células foram lavadas com PBS (135 mM de NaCl; 1,3 mM de KCl; 0,5 mM de KH₂PO₄; 3,2 mM de Na₂HPO₄) e então fixadas com metanol 100% por 20 minutos à temperatura ambiente. Após sucessivas lavagens com PBS, as mesmas foram incubadas com 40 mM de glicina-PBS por 5 minutos, e novamente lavadas com PBS. A seguir, as células foram incubadas com soro de bloqueio (5% de soro de jumento + 0,05% de Triton X-100 em PBS) durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram

incubadas com anticorpo primário diluído em soro de bloqueio e deixadas overnight sob agitação mínima a 4 °C ao abrigo da luz. No dia seguinte, as células foram lavadas com PBS (3 vezes por 10 minutos com PBS) e incubadas por 2 horas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz com anticorpo secundário (AlexaFluor 594; AlexaFluor 488; 1 : 2.000, Gibco-Invitrogen) diluído em PBS + 0,05% Triton X-100. Finalmente, as lamínulas contendo as células foram incubadas por 20 minutos a temperatura ambiente com DAPI (Sigma-Aldrich) (1 : 100.000, diluído em PBS + 0,05% de Triton X-100), lavadas novamente com PBS, montadas em lâmina com Fluoromount-G (Southern Biotech, Birmingham, AL, EUA) e seladas com esmalte transparente.

As células foram observadas com auxílio de microscópio de fluorescência Nikon Eclipse 80i (Nikon Instruments Inc., NY, EUA). As imagens foram capturadas pela Nikon Digital Camera DXM 1200C e analisadas pelo software de Imagem NIS-Elements Advanced Research 2.30 (Nikon Instruments Inc.). Foram fotografados trinta campos visuais em três culturas diferentes para amostragem e contados com auxílio do programa ImageJ (Image Processing and Analysis in Java, NIH, MD, USA).

4.3.4 *Coloração por hematoxilina / eosina*

Cortes histológicos de medula espinal, montados em lâminas gelatinizadas, foram lavados em água destilada. Após, foram incubados em solução de Hematoxilina de Harris por 2 minutos. Em seguida, foram lavados em água corrente para tirar o excesso de coloração. Após, foi realizada diferenciação com álcool ácido 0,3% até eliminação do *background*. Novamente, foram lavados em água corrente, passando para coloração com Eosina durante 2 minutos. Após estes passos, foi realizada bateria de desidratação na seguinte ordem: EtOH 50% I, 2 minutos; EtOH 50% II, 2 minutos; EtOH 70% I, 2 minutos; EtOH 70% II, 2 minutos; EtOH 100% I, 2 min; EtOH 100% II, 2 minutos; EtOH 100% + Xilol 1 : 1, 3 minutos; Xilol I, 5 minutos; Xilol II, 5 minutos. Por fim, as lâminas foram sobrepostas por lamínulas em meio de montagem D.P.X. (Sigma Aldrich).

4.3.5 *Extração de Proteínas Nucleares e Citosólicas*

As proteínas nucleares e citosólicas utilizadas para os ensaios de Western Blot e para a dosagem de citocinas foram extraídas com o auxílio do kit

ProteoJET™ Cytoplasmic and Nuclear Protein Extraction Kit (Fermentas Life Sciences), de acordo com as instruções do fabricante.

4.3.6 *Determinação da concentração de proteínas*

A dosagem foi realizada através do método de Bradford utilizando reagente da Bio-Rad e subsequente medição da absorbância no comprimento de onda de 595 nm em um leitor de microplacas Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader (BioTek, Winooski, VT, USA). A comparação com uma curva padrão de albumina forneceu a concentração de proteínas presente nas amostras.

4.3.7 *Análise das citocinas*

A análise das citocinas foi realizada na fração citosólica obtida no processo de extração proteica descrita acima e foram medidas através dos kits BD OptEIA™ ELISA Kits, seguindo as recomendações dos fabricantes.

4.3.8 *Determinação da expressão proteica do receptor de glicocorticoides (GR), da subunidade p65 do fator de transcrição NFκB, de CREB, ERK, EGR-1, de TNFα e caspase-1 por ensaio de Western Blot*

Através do ensaio de Western blotting, medimos a expressão nuclear e citosólica das proteínas GR e p65-NFκB. A razão entre as duas frações pode ser utilizada como índice de translocação e portanto, atividade dessas proteínas. As demais proteínas foram analisadas na fração citosólica obtida no processo de extração proteica descrita acima.

Após dosagem de proteínas pelo método do Bradford, descrito no item 4.3.6, as amostras foram diluídas em tampão Laemmli (125 mM de Tris-HCl; 4% de SDS; 20% v/v de glicerol; 200 mM de DTT e 0,02% de azul de bromofenol; pH 6,8) na concentração de 1 µg/µl e aquecidas a 95 °C por 5 minutos para que houvesse a denaturação das proteínas.

Vinte µg de cada amostra foram aplicados em gel 10% SDS-poliacrilamida (acrilamida/bisacrilamida 5 : 1, 10% de SDS) e submetidos à eletroforese (100 V, 2 horas), juntamente com um padrão de peso molecular (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, BioRad) em tampão de corrida (25 mM de Tris-Base, 192 mM de glicina, 0,1% de SDS em água destilada). Ao final da corrida, as proteínas separadas foram transferidas eletroforicamente para uma membrana de PVDF, em tampão de transferência gelado (25 mM de Tris-base, 192 mM de glicina, 20% de metanol em água destilada), a 400 mA por aproximadamente 2 horas. Após a transferência, para

verificar a igualdade da quantidade das proteínas aplicadas ao gel e a eficiência da transferência, as membranas foram incubadas em reagente de Ponceau S (0,5% Ponceau-S; 5% ácido tricloro acético e água bidestilada) por 3 a 5 minutos (Salinovich, Montelaro, 1986). Após essa etapa, as membranas foram lavadas com água destilada para retirar o reagente de Ponceau e incubadas por 2 horas em solução de bloqueio, constituído por 5% leite desnatado (Molico, Nestlé) em TBS-T (100 mM de Tris-base, 0,9% de NaCl, 0,1% de Tween 20 em água destilada), para bloquear ligações inespecíficas. Após essa etapa, as membranas foram lavadas em solução de TBS-T (TBS; 0,1% de Tween 20) e incubadas com anticorpos específicos: p65 e GR (1 : 1000, Santa Cruz Technology), ERK e p-ERK (1 : 5000, Cell Signaling Technology), CREB e p-CREB (1 : 1000, Cell Signaling Technology), TNF- α (1 : 500, Santa Cruz Technology), Caspase-1 (1 : 1000, Cell Signaling Technology), EGR-1 (1 : 1000, Santa Cruz Technology) *overnight* a 4 °C. Em seguida foram encubadas com anticorpos secundários 1 : 5000 durante 2 horas. A detecção do complexo antígeno-anticorpo foi feita através do kit de quimioluminescência ImmobilonTM Western Chemilumnescent HRP Substrate (Millipore, Billerica, MA, EUA), sendo que vários tempos de exposições foram feitos e analisados para garantir a linearidade das intensidades das bandas. Os anticorpos β -actina, α -tubulina ou GAPDH (1 : 20000, Santa Cruz Biotechnology) foram usados como controle interno.

4.3.9 *Remoção dos anticorpos (Stripping) para a reutilização das membranas de Western blot*

O método utilizado foi baseado no recomendado pela empresa Abcam® (Cambridge, MA, EUA). Após a revelação do Western blot, as membranas foram incubadas por 10 minutos (2 vezes) em tampão de remoção (stripping buffer: glicina 0,2 M; 0,1% SDS; 1% Tween 20, pH 2,2). Após esse tempo, as membranas foram lavadas em PBS (2 x 10 minutos) e depois em TBS-T (2 x 5 minutos). Ao final das lavagens, as membranas foram re-incubadas com a solução de bloqueio por pelo menos 1 hora e então se seguiu com a incubação com os anticorpos.

Cada membrana foi submetida a esse protocolo por duas vezes sendo a mesma membrana exposta a três anticorpos primários e secundários diferentes.

4.3.10 *Ensaio de Retardo da Mobilidade Eletroforética em gel de poliacrilamida (EMSA)*

4.3.10.1 MARCAÇÃO DA SONTA

O oligonucleotídeo de DNA contendo a sequência de ligação para o fator de transcrição do CREB ou NFkB (Promega corporation, Madison, WI, USA) foi marcado com a adição de γ -32P ATP em uma solução contendo tampão T4 quinase, enzima T4 quinase e água; nas concentrações de: 3,5 pmol de oligonucleotídeo, 1 U/ μ L de T4 quinase, 1 μ L de γ -32P ATP (111 GBq / mmol) (1 Ci = 3,7 GBq), 1 μ L de tampão T4 quinase (10 X) em 10 μ L de volume de reação. Após incubação a 37 °C por 10 minutos, o excesso de γ -32P ATP foi retirado com resina sephadex® G-25 (Microspin G-25; Millipore corporation, Billerica, MA, USA): as colunas foram colocadas em um tubo de microcentrifuga e submetidas à centrifugação por 1 minuto a 3.000 rpm. Em seguida, as colunas foram transferidas para um novo tubo e o volume total da sonda marcada foi aplicado no centro da resina. Após centrifugação, o eluato contendo a sonda foi recolhido e, no dia do ensaio, a atividade da sonda foi determinada. Para o ensaio foi utilizado aproximadamente 22.000 cpm/ μ L.

4.3.10.2 REAÇÃO DE LIGAÇÃO E CORRIDA DO GEL

Foram adicionados a um tubo de microcentrifuga: 4 μ L de tampão de ligação 5X (MgCl₂ 5 mM; EDTA 2,5 mM; DTT 2,5 mM; NaCl 300 mM; Tris-HCl 50 mM pH 7,5; Poly dIdc 0,25 μ g/ μ L; glicerol 20%); extrato nuclear (3 μ g de proteína para tecidos) e H₂O q.s.p. para 20 μ L de volume final (contando com a adição da sonda marcada). O tubo foi incubado por 20 minutos à temperatura ambiente, adicionando-se em seguida a sonda marcada (1 μ L), e novamente o tubo foi incubado por 30 minutos à temperatura ambiente. A corrida foi visualizada com a adição de 1 μ L de azul de bromofenol ao controle negativo. O conteúdo total do meio de reação foi aplicado no gel de poliacrilamida 5,5% [acrilamida/bisacrilamida (37,5 : 1)]. Para a eletroforese foi utilizado um tampão de corrida consistindo em 0,5 x TBE (1 X TBE = Tris 90 mM, Ácido Bórico 90 mM, EDTA 1 mM). O gel foi submetido à eletroforese por volta de 2 horas a 150-160 V. Ao final da corrida, o gel foi secado a vácuo, procedendo-se em seguida a exposição do filme ao gel em cassete a -80 °C, pelo período de 2 dias, seguida da revelação do filme. Os filmes foram revelados em sala escura em máquina de revelação automática Hyper Processor (Amersham Biosciences).

4.4 Análise dos resultados

Para análise da dosagem das citocinas, as diferenças entre os grupos experimentais e os grupos controles foram detectadas por análise de variância (ANOVA) de um critério associada ao teste Student-Newman Keuls, onde foram adotados valores para $p < 0,05$ como estatisticamente significativos.

Para análise dos escores clínicos, os dados foram tratados como análises repetidas e as diferenças entre os grupos experimentais e os grupos controles foram detectadas por análise de variância (ANOVA) de dois critérios associada ao teste de Bonferroni, onde foram adotados valores para $p < 0,05$ como estatisticamente significativos.

Os dados decorrentes do EMSA foram analisados quantitativamente através da medida da densidade óptica utilizando o software ImageJ (Image Processing and Analysis in Java, NIH, MD, USA). Os filmes foram escaneados através do aparelho ScanJet HP4050 (Hewlett-Packard Company, Palo Alto, CA, EUA) e as bandas específicas foram quantificadas, como descrito anteriormente. Os parâmetros obtidos estão expressos como % da média do grupo controle $\pm$ % erro padrão da média. Utilizamos análise de variância (ANOVA) de um critério, seguido do teste Bonferroni. O nível de significância foi fixado em no máximo 5% ($p < 0,05$).

Os dados decorrentes do ensaio de Western Blot foram analisados quantitativamente através da análise de densidade óptica utilizando sistema de detecção ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad) e o software Image Lab (Bio-Rad). Utilizamos análise de variância (ANOVA) de dois critérios, seguido do teste Bonferroni. O nível de significância foi fixado em no máximo 5% ($p < 0,05$).

Para análise de viabilidade em cultura de células pelo método de MTT, foi utilizada análise de variância (ANOVA) de dois critérios, seguido do teste Dunnet, para comparação com o grupo controle. O nível de significância foi fixado em no máximo 5% ($p < 0,05$).

Ainda, utilizamos a estatística descritiva para obtenção de médias e erro padrão da média. Todas as análises foram realizadas no programa GraphPad Prism7 software package, GraphPad Software, San Diego, CA, USA.

5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Figura 1 - Delineamento Experimental

Figura 1 – Delineamento Experimental através do tempo, de animais C57BL/6 fêmeas imunizados com MOG₃₅₋₅₅ acrescido de CFA tratados (DEX + EAE) ou não (EAE) com 50 mg/kg no dia da imunização.

6 RESULTADOS

6.1 O tratamento com Dexametasona no dia da imunização reduz o desenvolvimento dos sintomas da doença

Nos animais imunizados com MOG acrescida de BCG em CFA (*Complete Freund Adjuvant*), os sintomas da doença, medidos através de escore clínico, apareceram a partir do 10º dia pós-imunização (d.p.i.). Estes sinais clínicos aumentaram gradualmente conforme o passar dos dias, atingindo seu pico no 16º d.p.i. e retornando ao menor nível no 26º d.p.i. Já os animais tratados com Dexametasona (50 mg/kg) no dia da imunização apresentaram sintomas clínicos menos severos ao longo dos 26 dias quando comparados aos animais não tratados com DEX ($F(1,742) = 157,9$; $p < 0,0001$) (Figura 1A). Em relação a soma total dos escores clínicos durante todo o período de doença, o grupo EAE apresentou escore maior do que o grupo tratado com DEX ($22,98 \pm 2,968$ e $15,18 \pm 2,28$; $p < 0,0481$) (Figura 1B), mostrando que o tratamento promoveu proteção parcial dos sintomas motores causados pela EAE.

Figura 2 - Avaliação do escore clínico através do tempo

Figura 2 - Avaliação do escore clínico através do tempo, de animais C57BL/6 fêmeas imunizados com MOG₃₅₋₅₅ acrescido de CFA tratados (DEX + EAE) ou não (EAE) com 50 mg/kg no dia da imunização. A flecha vermelha indica o dia de tratamento com DEX, a flecha verde indica os testes comportamentais e a flecha azul indica o dia da eutanásia (A). O escore total foi obtido, para cada animal, no 26º d.p.i. foi usado para determinar a severidade da doença (B). Os resultados estão exibidos através da média $\pm$ erro padrão dos grupos experimentais (N = 15 e 16). * $p < 0,05$ vs EAE (Two-way ANOVA seguido do pós-teste Bonferroni (A) e Teste-T bi-caudal (B)).

6.2 Dex modula a corticosterona sérica em animais com EAE

Inicialmente foi realizada a administração de DEX 50 mg/kg ou salina via intraperitonal em animais C57BL/6 para a validação do tratamento. Os animais tratados com DEX apresentaram diminuição significativa dos níveis de corticosterona sérica, em relação ao grupo controle, a partir de 4 horas até 48 horas após a administração. Estes dados sugerem que a DEX (efeito médio da DEX: $F(1,43) = 75,29$, $P < 0,001$) bem como o tempo de ação do fármaco (efeito médio do tempo: $F(4,43) = 3,213$, $P = 0,0215$) geraram efeitos esperados, inibindo o eixo HPA e consequentemente, a produção e liberação de corticosterona (Figura 3).

Quando imunizados, animais com EAE no 8^o d.p.i. ainda não apresentam mudança na concentração de corticosterona sérica em relação ao grupo controle, além disso a concentração de corticosterona no grupo DEX retornou aos níveis do controle, revertendo a supressão do eixo HPA observada até 48 horas após a administração de DEX ($F(3,12) = 1,703$, $P = 0,2192$) (Figura 3). Contudo, após 16^o d.p.i., o grupo EAE apresentou aumento significativo dos níveis de corticosterona sérica em relação aos grupos controle e DEX, cuja corticosterona voltou ao nível do controle. Além disso, o grupo EAE+DEX apresentou níveis intermediários de corticosterona reduzida em relação ao grupo EAE. Como esperado, a concentração de corticosterona acompanhou a elevação do escore clínico de ambos grupos (EAE e EAE+DEX) ($F(3,14) = 12,08$, $P = 0,0004$) (Figura 2C). Contudo, no 26^o d.p.i. foram detectados níveis normais do hormônio nos animais controles com manutenção dos níveis elevados nos grupos EAE e EAE+DEX, sendo que este último não acompanhou a evolução do escore clínico ($F(3, 15) = 7,582$, $P = 0,0026$) (Figura 4).

Figura 3 - Quantificação dos níveis de corticosterona sérica após administração de DEX.

Figura 3 - Quantificação dos níveis de corticosterona sérica após administração de DEX 50mg/kg em diferentes tempos (A), 8 d.p.i. (B) 16 d.p.i. (C), 26 d.p.i. (D) de animais C57BL/6 fêmeas imunizados com MOG₃₅₋₅₅ acrescido de CFA tratados (DEX + EAE) ou não (EAE) com 50 mg/kg no dia da imunização. Os resultados estão exibidos através da média $\pm$ erro padrão dos grupos experimentais onde (*) representa diferença significativa em relação ao grupo controle, (#) em relação ao grupo DEX e (\$) em relação ao grupo EAE, em teste Two-way ANOVA seguido do pós-teste Bonferroni. $p < 0,05$ (N = 4 a 6).

6.3 Dex aumenta o peso do baço e linfonodo em animais com EAE no 26 d.p.i

A fim de avaliar os efeitos da DEX sobre a EAE na imunidade periférica, os baços e linfonodos foram pesados no 26º d.p.i. Interessantemente, houve aumento significativo do peso do baço em relação peso corporal somente no grupo EAE+DEX ($F(1,12) = 5,154$; $P = 0,0424$) (Figura 3A). Em relação ao tamanho do linfonodo, o grupo EAE apresentou aumento significativo em relação aos outros grupos experimentais, aumento esse revertido pelo tratamento com dexametasona (interação EAE e dexametasona: $F(1,12) = 59,93$; $P < 0,0001$). Entretanto, o aumento desses órgãos são indicativos indiretos de proliferação e diferenciação de células imunes.

Figura 4 - Peso em gramas do baço (A) e linfonodo (B) divididos pelo peso corporal

Figura 4 - Peso em gramas do baço (A) e linfonodo (B) divididos pelo peso corporal, de animais C57BL/6 fêmeas imunizados com MOG₃₅₋₅₅ acrescido de CFA tratados (DEX + EAE) ou não (EAE) com 50 mg/kg no dia da imunização. Os resultados estão exibidos através da média $\pm$ erro padrão dos grupos experimentais, onde (*) representa diferença significativa em relação ao grupo controle, (#) em relação ao grupo DEX e (\$) em relação ao grupo EAE, em teste Two-way ANOVA seguido do pós-teste Bonferroni $p < 0,05$ ($N = 4$).

6.4 EAE promove comportamento do tipo ansioso em teste de Labirinto em Cruz Elevado.

Para a avaliação de comportamento do tipo ansioso, foi realizado teste de Labirinto em cruz elevado (LCE) no 8º d.p.i. Inicialmente foram quantificados a porcentagem de tempo e entradas nos braços fechados do labirinto como controle motor, não havendo diferença significativa entre os grupos experimentais. Os grupos EAE e EAE+DEX apresentaram diminuição significativa em relação ao controle, no tempo de permanência nos braços abertos (efeito médio da EAE: $F(1, 28) = 17,21$, $P = 0,0003$) sem interação com a DEX (Interação: $F(1,28) = 2,729$, $P = 0,1097$) (Figura 4). Ademais, somente o grupo EAE+DEX apresentou diminuição significativa no número de entradas nos braços abertos em relação ao grupo controle (efeito médio da EAE: $F(1,28) = 9,475$, $P = 0,0046$) (Figura 5). O índice de ansiedade foi maior em animais com EAE em comparação aos grupos controle e DEX, mostrando que ambos os fatores (entrada e tempo no centro) estão diminuídos nestes animais (Figura 5).

Figura 5 - Tempo de permanência e número de entradas nos braços abertos no labirinto em cruz elevado

Figura 5 - Tempo de permanência e número de entradas nos braços abertos no labirinto em cruz elevado. Porcentagem de entradas nos braços fechados (A). Porcentagem de tempo nos braços fechados (B). Porcentagem de tempo nos braços abertos (C) Porcentagem de entradas nos braços abertos (D) Índice de Ansiedade (E). Os resultados estão exibidos através da média $\pm$ erro padrão dos grupos experimentais, onde (*) representa diferença significativa em relação ao grupo controle e (#) representa diferença significativa em relação ao grupo DEX, em teste Two-way ANOVA seguido do pós-teste Bonferroni. $p < 0,05$. $N = 8$ e 9 . Os dados foram analisados através de software Any Maze (Stoeling).

6.5 EAE promove comportamento do tipo ansioso em teste de Campo Aberto.

O teste de campo aberto foi realizado no 4º d.p.i., que corresponde ao primeiro dia de treino para o teste de reconhecimento de objetos. Inicialmente não houve diferença na velocidade máxima e na velocidade média entre os grupos. Estes dados mostram que o processo de imunização e a administração de dexametasona não influenciaram na atividade locomotora dos animais (Figuras 6A, 6B e 6C). Quanto a avaliação do comportamento do tipo ansioso, os grupos DEX e EAE+DEX apresentaram diminuição no número de entradas na região central em relação ao grupo controle ($F(1,22) = 14,37$; $P = 0,0010$), indicando que o tratamento com dexametasona aumenta o comportamento do tipo ansioso nestes animais (Figura 6D). Contudo, somente o grupo EAE+DEX apresentou diminuição significativa no tempo despendido na região central (Efeito médio da DEX: $F(1,22) = 8,337$; $P = 0,0085$) (Figura 6).

Figura 6 - Tempo de permanência e número de entradas na região central do Campo Aberto no 4º d.p.i.

Figura 6 - Tempo de permanência e número de entradas na região central do Campo Aberto no 4º d.p.i. Distância total percorrida em metros no Campo Aberto (A). Velocidade máxima em m/s atingida no Campo Aberto (B). Velocidade média atingida no Campo Aberto (C) Número de entrada na região central do Campo Aberto (D) Porcentagem de tempo na região central do Campo Aberto (E). Os resultados estão exibidos através da média $\pm$ erro padrão dos grupos experimentais, onde (*) representa diferença significativa em relação ao grupo controle, em teste Two-way ANOVA seguido do pós-teste Bonferroni. $p < 0,05$. $N = 8$ e 9 . Os dados foram analisados através de software Any Maze (Stoeling).

Além de avaliar o comportamento do tipo ansioso pelo LCE e pelo CA no 4º d.p.i., os animais passaram pelo CA no 8º d.p.i. Como esperado, não houve diferenças na distância percorrida, na velocidade máxima e na velocidade média entre todos os grupos experimentais, excluindo possíveis prejuízos locomotores nestes animais (Figura 7A, 7B e 7C). Em relação ao número de entradas na região central, somente o grupo EAE apresentou redução significativa comparado aos outros grupos experimentais e sendo revertido pelo tratamento com dexametasona (Efeito médio da EAE: $F(1,30) = 13,60$; $P < 0,0009$) (Figura 7D). Contudo não houve diferença no tempo total de permanência na região central entre os grupos (Figura 7).

Figura 7 - Tempo de permanência e número de entradas na região central do Campo Aberto no 8º d.p.i.

Figura 7 - Tempo de permanência e número de entradas na região central do Campo Aberto no 8º d.p.i. Distância total percorrida em metros no Campo Aberto (A). Velocidade máxima em m/s atingida no Campo Aberto (B). Velocidade média em m/s atingida no Campo Aberto (C). Número de entrada na região central do Campo Aberto (D) Tempo na região central do Campo Aberto (E). Os resultados estão exibidos através da média $\pm$ erro padrão dos grupos experimentais, onde (**) representa diferença significativa em relação ao grupo controle, (##) representa diferença significativa em relação ao grupo DEX e (&) representa diferença significativa em relação ao grupo EAE+DEX, em teste Two-way ANOVA seguido do pós-teste Bonferroni. $p < 0,05$. $N = 8$ a 10 . Os dados foram analisados através de software Any Maze (Stoeling).

6.6 EAE não altera o equilíbrio e a sensibilidade dolorosa até o 8º dia pós-imunização.

Para excluir a possibilidade de que as alterações comportamentais encontradas fossem decorrentes de um possível aumento da sensibilidade dolorosa e de um eventual déficit locomotor, os animais foram submetidos ao teste de pressão nas patas e ao rotarod respectivamente em dias diferentes antes do aparecimento dos escores clínicos.

Como podemos observar na figura 8A, os animais que desenvolveram EAE não apresentaram déficit motor quando testados no rotarod. As análises foram feitas nos 6º, 7º e 8º dias pós-imunização. Em relação à sensibilidade dolorosa, podemos observar na figura 8B que apenas os animais não doentes tratados com dexametasona apresentaram um aumento à sensibilidade dolorosa no 8º d.p.i. quando comparados aos animais controles não imunizados.

Figura 8 - Tempo em segundos (s) para a queda dos animais expostos ao teste do rotarod (A)

Figura 8 - Tempo em segundos (s) para a queda dos animais expostos ao teste do rotarod (A). Sensibilidade à dor medido pelo teste de Randall-Selitto (B). Os resultados estão exibidos como média $\pm$ erro padrão da média dos grupos experimentais, onde (*) representa diferença significativa em relação ao grupo controle, $p < 0,05$. (One-way ANOVA seguido pelo teste de Student-Newman Keuls; $n = 3$ e 6).

6.7 Dexametasona não protege contra a diminuição na memória de longa duração em animais com EAE.

O teste de reconhecimento de objetos foi realizado segundo descrito nos métodos. No teste realizado no 8º d.p.i., os animais imunizados e tratados com Dexametasona apresentaram menor taxa de exploração do Objeto Novo (ON) do que os outros grupos experimentais 24 horas após o treino (Figuras 9A e 9B). Ainda, houve manutenção da diminuição exploratória do ON, 24 horas após o treino em

ambos grupos EAE e EAE+DEX no 26 d.p.i. Estes resultados sugerem que os glicocorticoides não revertem a perda de memória e aprendizado de tarefas exploratórias neutras provocados pela EAE (Figuras 9C e 9D).

Figura 9 - Análise de memória neutra por teste de Reconhecimento de Objetos (RO) em diferentes tempos, 8^o e 26^o d.p.i.

Figura 9 - Análise de memória neutra por teste de Reconhecimento de Objetos (RO) em diferentes tempos, 8^o e 26^o d.p.i. Razão de discriminação no treino, determinado pelo tempo de exploração de dois objetos iguais 7 d.p.i. (A). Razão de discriminação no teste após a troca de um dos objetos, duas e vinte quatro horas após o treino 8 d.p.i. (B). Razão de discriminação no treino, determinado pelo tempo de exploração de dois objetos iguais 25 d.p.i. (C). Razão de discriminação no teste após a troca de um dos objetos, vinte quatro horas após o treino 26 d.p.i. (D). Os resultados estão exibidos através da média $\pm$ erro padrão dos grupos experimentais, onde (*) representa diferença significativa em relação ao grupo controle, (#) representa diferença significativa em relação ao grupo DEX, em teste Two-way ANOVA seguido do pós-teste Bonferroni. $p < 0,05$. $N = 7$. Os dados foram analisados através de software Any Maze (Stoeling).

6.8 Dexametasona não protege contra a diminuição na memória contextual em animais com EAE.

Figura 10 - Análise de memória contextual de medo 24 horas após choque, no 26º d.p.i.

Figura 10 - Análise de memória contextual de medo 24 horas após choque, no 26º d.p.i. O gráfico acima representa a porcentagem de tempo de freezing realizado pelos diferentes grupos experimentais. Os resultados estão exibidos através da média $\pm$ erro padrão dos grupos experimentais, onde (*) representa diferença significativa em relação ao grupo controle e (#) representa diferença significativa em relação ao grupo DEX, em teste Two-way ANOVA seguido do pós-teste Bonferroni. $p < 0,05$. $N = 5$ a 7 . Os dados foram analisados através de software Any Maze (Stoeling).

A fim de investigar se outros tipos de memória podem ser afetados pela EAE e modulados pelos glicocorticoides, foi realizado teste memória contextual aversiva. Após 24 horas do choque (1 mA), os grupos EAE e EAE+DEX apresentaram diminuição na formação de memória aversiva em relação aos grupos controle e DEX (Efeito médio da EAE: $F(1,19) = 28,03$; $P < 0,0001$) (Figura 10). Estes dados mostram que a EAE pode prejudicar tanto a formação de memórias neutras quanto de memórias aversivas.

7 DISCUSSÃO

Modelos animais de doenças degenerativas são muito utilizados na pesquisa a fim de investigar mecanismos celulares e moleculares pelos quais são causadas. Em nosso paradigma, animais com EAE apresentaram sintomas clínicos comumente encontrados em outros trabalhos, evidenciando a perda aguda, progressiva e ascendente do tônus muscular culminando com paralisia parcial ou total dos membros. Estes estão em linha com outros estudos (LASSMANN et al., 2011) que mostram como a neurodegeneração e a desmielinização, decorrentes da inflamação produzida pelas células imunes, apresentam marcadores semelhantes à EM.

Apesar das semelhanças fisiopatológicas que ratificam a EAE como um modelo fidedigno para o estudo da EM, existem diferenças histopatológicas e moleculares que devem ser levadas em consideração: Primeiro, o perfil linfocitário apresentado na EAE caracteriza-se principalmente por Linfócitos TCD4⁺, enquanto que as células mais encontradas na EM são Linfócitos TDC8⁺, estas características não excluem a presença de células com ambos perfis nas respectivas doenças (GOVERMAN et al., 2009). Segundo, estudos realizados *pós-mortem* mostraram que na EM há presença de desmielinização e remielinização, principalmente nos estágios iniciais da doença, Enquanto que, na EAE há desmielinização somente em alguns modelos, principalmente os induzidos com peptídeos (PBM e MOG) (LASSMANN et al., 2011). Contudo, características como o reconhecimento de antígenos de mielina pelas células imunes, presença de infiltrado celular periférico no SNC, ativação microglial e degeneração neuronal retrógrada validam estes como modelos de doenças autoimunes.

Na EM a autoimunidade provoca uma vasta amplitude de sintomas, já que as fibras nervosas afetadas inervam diferentes órgãos e sistemas, por isso o diagnóstico se faz tão difícil e impreciso. Neste contexto, a alta prevalência de comorbidades em decorrência da EM apresentam-se como desafio na clínica, representando mais uma dificuldade de prognóstico (CHIARAVALLLOTI, DELUCA; 2008). Além disso, transtornos de ansiedade, depressão; diminuição de aquisição, consolidação e extinção de memória foram mostrados em diversos modelos experimentais de EM (Acharjee, et al, 2013; Filippo et al, 2016).

Sabendo que o foco inicial de inflamação na EAE compreende a região da substância branca, os mecanismos celulares e moleculares envolvidos no

aparecimento de sintomas não-motores na fase pré-sintomática necessitam de maiores investigações. Talvez, a ativação precoce das células da glia na substância cinzenta sejam um caminho para elucidar esta problemática.

A progressão dos sinais clínicos na EAE está diretamente relacionada com os tipos de resposta e citocinas liberadas por macrófagos, células dendríticas e linfócitos. Geralmente, o início dos sinais está ligado à liberação de IL-12, IL-23, IL-1 β , IL-6 e TNF- α , enquanto que as fases de pico e remissão são caracterizadas pela liberação de IL-2, IFN γ e IL-17 (SIMMONS et al., 2013; KAWABE et al, 2012). Além disso, há diferenças no tipo de infiltrado em diferentes regiões do SNC, o que pode ser modificado no decorrer da doença ou por tratamentos farmacológicos.

Um desses modificadores, os glicocorticoides, atuam de forma ampla; reprimindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias pelas células imunes; reprimindo a expressão de moléculas de adesão, as quais previnem o rolamento, adesão e extravasamento de neutrófilos para o sítio de inflamação; também induzem a expressão de anexina 1, provocando apoptose de neutrófilos; modulam a expressão gênica em macrófagos, induzindo a mudança do perfil pró-inflamatório (M1) para o anti-inflamatório, aumentando sua capacidade fagocítica (M2); bloqueiam a produção de citocinas derivadas de TH1 e TH2, induzindo morte celular (CRUZ-TOPETE; CIDLOWSKI, 2015).

Assim como em outras doenças inflamatórias e autoimunes, o eixo hpa parece desempenhar um papel relevante no controle da inflamação. Contudo, a desregulação deste eixo pode aumentar-lá. Em nosso paradigma experimental, corroborando dados da literatura, houve aumento da atividade do eixo em animais com EAE a partir do 8º d.p.i., com manutenção da hiperatividade durante todo percurso de doença, até o 26º d.p.i. A hiperatividade do eixo HPA é muito discutida na literatura como uma tentativa do controle da inflamação por parte do organismo, contudo o aumento de glicocorticoides circulantes não é capaz de controlar a neuroinflamação. Essa falta de resposta aos GCs pode ser explicada pela regulação descendente de GR, pela fosforilação do GR, pelo balanço entre MR e GR ou pela regulação ascendente de subtipos repressores de GR.

Essas mudanças no eixo podem acarretar em mudanças comportamentais importantes, já que neste estudo os animais com EAE e tratados com Dexametasona apresentaram variações no comportamento do tipo ansioso em intervalo de poucos dias, onde animais tratados com DEX apresentaram diminuição

no tempo e número de entradas no braço aberto do LCE no 4º d.p.i. e animais com EAE somente no 8º d.p.i.. Estes dados nos permitem inferir que somente a administração de Dexametasona em altas doses é capaz de desregular o eixo, a ponto de provocar o comportamento ansioso, como já descrito em outros trabalhos (MITRA E SAPOLSKY, 2009; NGUYEN et al, 2017). Ainda, a inflamação provocada pela EAE possui efeito mais tardio sobre este comportamento, talvez devido, sua ação inicialmente periférica.

De forma interessante, o grupo EAE+DEX apresentou um retardamento no aumento da corticosterona sérica, alcançando seu pico no 26º d.p.i.. Este efeito dúbio pode estar relacionado à desregulação do eixo HPA ou à um efeito rebote, já que a dose administrada é considerada alta (como no tratamento da crise de EM) (SORENSEN et al., 2009). Harpaz e colaboradores em 2013 mostraram que o estresse crônico imprevisível promove aumento de corticosterona sem acomodação do eixo HPA, aumentando os níveis de citocinas pró-inflamatórias e os sinais clínicos na EAE. Apesar de estarmos usando um glicocorticoide sintético, a dexametasona, nossos resultados também sugerem uma relação direta entre os níveis desse fármaco e o aumento de alguns aspectos da resposta inflamatória observada na EAE.

Os sintomas de ansiedade, geralmente estão associados a hiperatividade do BLA e inibição do hipocampo. Diversos estudos mostraram que a excitabilidade dos neurônios piramidais no BLA provocada por estimulação elétrica, produzem comportamento ansioso. Além disso, a infusão de agonistas GABA_A, como o muscimol produzem efeito ansiolítico, mostrando que essas duas vias no BLA podem estar relacionadas ao aparecimento de comportamento ansioso em murinos (FANSELOW, 2013; SANDERS, SHEKHAR 1998). Os glicocorticoides, por sua vez podem aumentar a excitabilidade do neurônios piramidais do BLA quando administrados em altas doses, aumentando a arborização dendrítica após 12 dias, como mostrado por Mitra e Sapolsky (2009).

Como já foi mostrado em outros trabalhos (COMINSKI et al, 2014; GOULD et al, 1990), a grande quantidade de GR no hipocampo faz com que esta estrutura seja bastante responsiva aos efeitos dos glicocorticoides. A adrenalectomia em animais e exames de ressonância magnética em pacientes com PTSD, mostraram que os sintomas de ansiedade estão relacionados com diminuição do número de dendritos e diminuição da sobrevivência das células granulares do giro denteado e

diminuição de volume hipocampal em CA3/GD, respectivamente. É importante frisar que em nossos experimentos, o comportamento ansioso apresentado pelo grupo EAE no 8º d.p.i. está acompanhado da redução da atividade neuronal no hipocampo, medida através da diminuição de EGR-1. Além disso, a diminuição na aquisição de memória neutra avaliada por teste de reconhecimento de objetos, corrobora o aumento da translocação de GR no hipocampo de camundongos com EAE. Neste sentido, a ação dos GCs sobre a inflamação causada na EAE pode influenciar na neurotransmissão em áreas que comunicam-se diretamente ao hipotálamo e hipófise.

Acharjee e colaboradores (2013), mostraram que a diminuição da memória espacial em labirinto aquático de Morris e o comportamento ansioso no LCE, estão diretamente relacionados com aumento de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α) no hipotálamo e, consequentemente, com o aumento de Corticosterona sérica em camundongos com EAE. Além disso, Harpaz et al., (2013) mostraram que alterações nos níveis plasmáticos de corticosterona aumentam tanto o comportamento do tipo ansioso quanto o escore clínico na EAE em C57BL/6 após Estresse Variável Imprevisível (EVI). Em contraste, Leza et al., (2010) mostraram que o estresse crônico por contenção promove diminuição do escore clínico e de marcadores inflamatórios em ratos Aguti. Estes dados mostram como a intensidade, tipo e duração do estímulo podem gerar respostas dicotômicas no comportamento e evolução da doença autoimune.

Os efeitos da EM sobre a cognição são pouco estudados, contudo, com a crescente pesquisa sobre as interações neuroimunes, várias vias e interações de células neuronais e leucocitárias estão sendo descobertas (PERUGA et al., 2011; CHIARAVALLLOTI et al., 2008; PEREZ-NIEVAS et al., 2007). Há grande dificuldade de se realizar testes precisos para avaliação cognitiva em animais com EAE, visto que a maioria dos testes comportamentais de memória, aprendizado, ansiedade e depressão necessitam de um arcabouço locomotor, o qual é prejudicado pela doença. Sob nossas condições experimentais, não foram encontradas discrepâncias locomotoras e sensoriais táteis/dolorosas entre os grupos experimentais até o 8º d.p.i.

Em nosso modelo, observamos o aparecimento dos sinais clínicos por volta do 10º dia após a imunização com pico no 16º dia e remissão parcial entre o 25º e 26º dia, contudo animais tratados com dexametasona apresentaram sinais mais

brandos nos mesmos dias quando comparados aos animais não tratados. Estes achados estão de acordo com a extensa literatura que embasa o papel dos GCs como imunossuppressores clássicos (SCHWEINGRUBER et al., 2012; CLARCK et al., 2003), inclusive sua utilização nos momentos de crise da EM (HEESEN et al., 2007; SORENSEN et al., 2009). Neste paradigma, a utilização de altas doses de GCs imediatamente após a imunização, podem inibir a apresentação de antígenos por macrófagos e células dendríticas, inibir a ativação e expansão clonal de linfócitos TH1 e diminuir sua migração através da BHE pela inibição de quimiocinas (e.g. CXCL10 e CCL20) e integrinas (e.g. LFA1 e VLA4) (FISCHER et al., 2013). Contudo, no que se refere ao comportamento, a Corticosterona não foi capaz de produzir a mesma proteção em nossos experimentos. Ademais, é sabido que os GCs aumentam a consolidação de memória de forma dose-dependente, todavia estes eventos dependem da ativação concomitante do sistema noradrenérgico. Ainda, altas doses de GCs sem ativação noradrenérgica podem prejudicar a memória (ROOZENDAAL, WILLIAMS, MCGAUGH, 1999).

Em dados preliminares de nosso laboratório utilizando o mesmo modelo de EAE, animais tratados com Fingolimod (FTY-720), um antagonista de receptor de esfingosina 1-fosfato, capaz de promover internalização e degradação do receptor (10 mg/Kg no dia da imunização), apresentaram melhora na consolidação de memória em animais com EAE no 8º d.p.i.. Estes dados são interessantes, visto que estes imunomoduladores inibem a proliferação e infiltrado celular no SNC, via diminuição da sinalização de STAT3 e consequente inibição de linfócitos TH17. Além disso, estes receptores estão presentes em astrocitos e parecem influenciar no egresso de células imunes ao SNC (GARRIS et al, 2013). Talvez, a ação do FTY-720 promova alteração do perfil astrocitário sem alterar sua comunicação com os neurônios, ao contrário do tratamento com GCs.

Estudos anteriores mostraram que a administração de glicocorticoides pós-treino não aumentou a retenção da memória em teste de reconhecimento de objetos. Contudo, a administração de yohimbina, um estimulador da liberação de noradrenalina, melhora a consolidação de memória induzida por GCs (ROOZENDAAL et al, 2009). Neste sentido, a consolidação de memórias neutras pelos GCs, em nossos resultados, podem estar relacionados com a liberação de noradrenalina no BLA e no hipocampo. A partir da ligação dos GCs aos seus receptores, os eventos que se seguem, e que culminam na consolidação de

memórias geralmente passam pela dimerização e translocação do receptor para o núcleo celular, ligando-se aos sítios GREs no DNA e transcrevendo genes relacionados a proliferação e plasticidade neuronal. Todavia, estudos recentes mostraram que os GCs também possuem diversas ações não-genômicas, através de interações com variantes de receptores esteroides. A ativação desses receptores esteroides de membrana resultam em rápida liberação de glutamato pelos sítios pós-sinápticos e inserção rápida de subunidades de receptores AMPA nos sítios pós-sinápticos (Karst et al, 2005).

A produção de citocinas pró-inflamatórias na EAE pode ativar vias inflamatórias no SNC. Astrocitos e células microgliais, possuem receptores de citocinas e moléculas apresentadoras de antígenos que sinalizam e reverberam a resposta inflamatória para o SNC, modificando ou impedindo a neurotransmissão. Como mostrado em estudos recentes, os GCs podem atuar diretamente nas células da glia aumentando a transcrição de citocinas e de receptores como DAMPs e PAMPs, após estímulos inflamatórios. Nossos resultados mostraram que o tratamento com DEX aumentou a produção de TNF- α alinhada com aumento do número e modificação morfológica de astrócitos no hipocampo de animais com EAE. Além disso, é sabido que estímulos inflamatórios como IL-1 β e TNF- α podem ativar a via do NFkB, através da ativação de TRAFs (fatores associados a receptores Toll), os quais podem ativar a via das MAPK ou PI3K-AKT. A subunidade p65 do NFkB, por sua vez, pode modular genes como RANTES, ICAM-1 e IL-1 (ver OECKINGHAUS 2011).

As células da glia possuem participação crucial na EM e em outras doenças neurodegenerativas, aumentando a corrente inflamatória inicial através do aumento da expressão de quimiocinas, tais como: MCP1, CCL2, CX3CL2 e da liberação de citocinas e radicais livres (BOSSHER et al., 2003; BIBER, 2007). O laniquimod, (Imunomodulador em estudo clínico de fase III utilizado na EM Recorrente Remitente), por exemplo, pode inibir a ativação astrocitária e bloquear o NFkB em astrócitos mas não na microglia (ver LASSMANN 2014). Interessantemente, animais tratados com DEX na EAE apresentaram aumento do número e mudança na morfologia de astrócitos em relação aos demais grupos experimentais. Esses dados vão ao encontro a diversos trabalhos que mostram a suscetibilidade da glia ao insulto inflamatório após sensibilização com glicocorticoides (BIBER et al., 2007, RAMOS-REMUS et al., 2002). Contudo, inúmeros trabalhos mostram diminuição do

número de astrócitos em doenças neurodegenerativas e em tratamento com GCs, mostrando como o efeito destes fármacos pode ser variável.

Sendo que a mudança de número e morfologia astrocitária é recorrente na EAE. Em nossos resultados, os astrócitos mostraram uma hiperatividade decorrente da EAE no 8º d.p.i., todavia esta modificação só foi evidenciada no grupo EAE+DEX no 26º d.p.i.. Interessantemente, esses fenômenos estão colocalizados temporalmente com o aumento da Corticosterona sérica. Ainda, o aumento astrocitário parece estar inversamente relacionado com diminuição da atividade hipocampal. Estes achados vão ao encontro de Filippo e colegas (2016), que mostraram que o tratamento com metilprednisolona não é capaz de reverter a diminuição no PEPS em fatias de hipocampo de animais com EAE. Ainda, esta diminuição do PEPS parece ser causada por citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β) liberadas por células microgliais.

Juntamente a modificação astrocitária, coincide o aumento da expressão de hemicanais como a Panx1, a qual pode aumentar a liberação de glutamato e ATP pelos astrócitos para o espaço extracelular. Este excesso de ATP e glutamato ativam canais do tipo NMDA e P2X₇, que aumentam a concentração de Ca⁺⁺ intracelular, ativando vias de caspases e inflamossomos que culminam em morte celular por apoptose. Curiosamente, os astrócitos são mais resistentes à apoptose causada por ATP e íons devido sua capacidade maior de tamponamento, entretanto altas concentrações de ATP e K⁺ podem levar à apoptose astrocitária (Jackson et al., 2014). Nossos resultados em culturas enriquecidas de astrócitos mostraram que o tratamento com Dexametasona aumenta a expressão de Panx1 na presença de IL17 (citocina presente em grande concentração no cérebro com EAE) provavelmente pelo aumento da concentração de K⁺ e ATP. Esses resultados são interessantes, visto que em estudo de Orellana e colaboradores (2015) animais que passaram por estresse de contenção, aumentaram a atividade de hemicanais via sinalização de NMDA e P2X₇.

Neste sentido, o NFkB apresentou aumento da translocação de p65 e aumento da atividade de NFkB no 26º d.p.i.. O aumento da atividade do NFkB e diminuição da memória espacial aqui encontrados, corroboram com os dados de Koo et al., (2009), que mostraram aumento da liberação de IL1 β via NFkB e diminuição da neurogênese no hipocampo, promovido pelo estresse e tratamento com corticosterona. Além disso, Inoue et al., em 2012 utilizando animais *Knockout*

para a proteína adaptadora do inflamassoma, ASC^{-/-}, mostraram que a ativação de NFkB na EAE produz IL1 β , que promove expansão clonal de linfócitos TH17, os quais necessitam de NLRP3 para migração e produção de mais IL1 β e IL-18 no cérebro.

Déficits de memória são muito comuns em doenças neurodegenerativas. A memória espacial, por sua vez, é bastante afetada, pois é armazenada e consolidada no hipocampo, o qual está sujeito a muitos estímulos inflamatórios e estressores devido sua localização peri-ventricular e interação com diversas estruturas encefálicas (PEREZ-NIEVAS, 2007). Visto isso, a diminuição significativa do índice de exploração do objeto novo em relação ao grupo controle, apresentada pelos grupos EAE e EAE+DEX, mostram que a Dexametasona protegeu contra as modificações da EAE no hipocampo, dificultando o aprendizado de tarefa de longa duração. Estes dados estão em consonância com os apresentados por Koo e Dulman (2010), já que o estresse agudo por contenção diminuiu a neurogênese no giro denteado do hipocampo em ratos via ativação de NFkB. Além disso, Munhoz et al., (2006) mostraram que o aumento da secreção de corticosterona provocada por estresse crônico imprevisível, induz a ativação do NFkB, exacerbando a inflamação no hipocampo.

Outro fator de transcrição importante na avaliação da atividade neuronal é o CREB, o qual aumenta consideravelmente em várias áreas, inclusive o hipocampo (ZHOU et al., 2009). Este fator de transcrição geralmente é ativado pela via das MAPKs, que consiste na ativação da GTPase RAS; que ativa isoformas das famílias das RAF, as quais fosforilam a enzima MEK, que fosforila ERK e por fim ativam o CREB (CAO, 2013). Em nosso paradigma, os grupos EAE e EAE+DEX apresentaram diminuição da ligação do CREB no DNA em ensaio de EMSA, mostrando que a EAE promove diminuição da atividade neuronal. Entretanto, o tratamento com dexametasona não potencializou esta redução, mostrando que os efeitos comportamentais podem estar sendo ocasionados por outras fontes inflamatórias, como; expressão de citocinas e quimiocinas ativando ou inativando células da glia (BEZZI et al., 2001). Além disso, o aumento de ERK apresentado pelo grupo EAE+DEX no 26º d.p.i.

8 CONCLUSÃO

Nossos resultados mostraram que o tratamento com Dexametasona no dia da imunização com MOG₃₅₋₅₅ acrescido de CFA e *Pertussis* diminui o escore clínico de camundongos C57BL/6 fêmeas com EAE. Entretanto, houve aumento dos níveis de corticosterona sérica, acompanhando a evolução do escore clínico. Já os animais tratados com Dexametasona apresentaram retardo deste aumento. Ainda, houve aumento do tamanho do baço e diminuição do tamanho do linfonodo após 26 dias no grupo EAE+DEX. Além disso, houve aumento da translocação de GR e da subunidade p65 do NFkB no hipocampo no grupo EAE+DEX, após 8 e 26 dias respectivamente. No entanto, apesar de promover melhora no escore clínico, a Dexametasona aumentou o comportamento do tipo ansioso no 8º d.p.i. e prejudicou a memória especial de longa duração no 8º e 26º d.p.i., alinhado com astrogliose e redução de Δ -FOSb em CA1 no 26º d.p.i.. Corroborando estes achados, experimentos in vitro mostraram que o tratamento com dex e IL17 aumentaram a expressão de Panexina-1, a translocação de GR e expressão de p65 em astrocitos.

REFERÊNCIAS*

- ALOISI, F., et al. Intracerebral regulation of immune responses. **Ann med.**, v. 33, p. 510-515, 2001.
- AMATO, M. P¹., et al. The rao's brief repeatable battery and stroop test: normative values with age, education and gender corrections in an italian population. **Mult scler.**, v. 12, p. 787-793, 2006.
- ANDERSON, A. E., et al. Immunity 12 years after alemtuzumab in ra: cd5+ b-cell depletion, thymus-dependent t-cell reconstitution and normal vaccine responses. **Rheumatology**., v. 51, p. 1397-1406, 2012.
- AWASTHI A., et al. A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory t cells. **Nat immunol**., v. 8, p. 1380-1389, 2007.
- BATTAGLIA, M., et al. Rapamycin and interleukin-10 treatment induces t regulatory type 1 cells that mediate antigen-specific transplantation tolerance. **Diabetes**., v. 55, p. 40-49, 2006.
- BEZZI, P.; VOLTERRA, A. A neuron-glia signalling network in the active brain. **Curr opin neurobiol**., v. 11, p. 387-394, 2001.
- BIBER, K., et al. Neuronal 'on' and 'off' signals control microglia. **Trends neurosci**., v. 30 p. 596-602, 2007.
- BOSSHER K., BERGHE W. V., HAEGEMAN G. The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kb or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. **Endocrine reviews**., v. 24, p. 488-522, 2003.
- BRUNNER, R., et al. Effect of corticosteroids on short-term and long-term memory. **Neurology**., v. 64, p. 335-337, 2005.
- CALLEGARO, D., et al. The prevalence of multiple sclerosis in the city of sao paulo, brazil, 1997. **Acta neurol scand**., v. 104, p. 208-213, 2001.
- CANNELLA, B.; RAINE C.S. multiple sclerosis: cytokine receptors on oligodendrocytes predict innate regulation. **Ann neurol**., v. 55, p. 46-57, 2004.

*De acordo com:

Associação Brasileira de Normas Técnicas **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CAO G., et al. Distinct roles of methamphetamine in modulating spatial memory consolidation, retrieval, reconsolidation and the accompanying changes of erk and creb activation in hippocampus and prefrontal cortex. **Neuropharmacology**,. v. 67, p. 144–154, 2013.

CHANDLER, N., et al. Acute stress shortens the time to onset of experimental allergic encephalomyelitis in sjl/j mice. **Brain behav immun**,. v. 16, p. 757-763, 2002.

CHANG, A., et al. Neurogenesis in the chronic lesions of multiple sclerosis. **Brain**,. v. 131, p. 2366-2375, 2008.

CHARMANDARI, E., et al. The human glucocorticoid receptor (hgr) beta isoform suppresses the transcriptional activity of hgralpha by interfering with formation of active coactivator complexes. **Mol endocrinol**,. v. 19, p. 52-64, 2005.

CHIARAVALLLOTI, N. D.; DELUCA J. Cognitive impairment in multiple sclerosis. **Lancet neurol**,. v. 7, p. 1139-1151, 2008.

CHWASTIAK, L.; et al. Depressive symptoms and severity of illness in multiple sclerosis: epidemiologic study of a large community sample. **Am j psychiatry**,. v. 159, p. 1862-1868, 2002.

CLARK, A. R.; LASA M. Crosstalk between glucocorticoids and mitogen-activated protein kinase signalling pathways. **Curr opin pharmacol**,. v. 3, p. 404-411, 2003.

CUA, D.J., et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. **Nature**,. v. 421, p. 744-8, 2003.

DALLMAN, M.F. fast glucocorticoid actions on brain: back to the future. **Front neuroendocrinol**,. v. 26, p. 103-108, 2005.

DONG, Y.; benveniste e.n. immune function of astrocytes. **Glia**,. v. 36, p. 180-90, 2001.

Fanselow MS. *Fear and Anxiety Take a Double Hit From Vagal Nerve Stimulation*. Biol Psychiatry. 2013 Jun 1;73(11):1043-4.

FARRAR, M.A.; SCHREIBER R.D. the molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. **Annu rev immunol**,. v. 11, p. 571-611, 1993.

FERRARI, C.C., et al. Reversible demyelination, blood-brain barrier breakdown, and pronounced neutrophil recruitment induced by chronic il-1 expression in the brain. **Am j pathol**,. v. 165, p. 1827-37, 2004.

FERREIRA, M.L. Epidemiology of 118 cases of multiple sclerosis after 15 years of follow-up on the reference center of hospital da restauração, recife, pernambuco, brazil. **Arq neuropsiquiatria**,. v. 62, p. 1027-32, 2004.

FISCHER H. J. SCHWEINGRUBER N., LÜHDER F., REICHARD H. M. The potential role of t cell migration and chemotaxis as targets of glucocorticoids in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. **Mol and cell endocrinology**,. v. 380, p. 99-107, 2013.

FRAGOSO Y.D. prevalence of multiple sclerosis in the city of santos, são paulo. **Rev bras epidemiol**,. v. 10, p. 479-482, 2007.

Frank, I., et al. Impact of cognitive impairment on mild dementia patients and mild cognitive impairment patients and their informants. **Int psychogeriatr**,. v. 18, p. 151-162, 2006.

FRANK, M.G., et al. Prior exposure to glucocorticoids sensitizes the neuroinflammatory and peripheral inflammatory responses to e. Coli lipopolysaccharide. **Brain behav immun**,. v. 24, p. 19-30, 2010.

GLASS, C.K., et al. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. **Cell**,. v. 140, p. 918-34, 2010.

GOEL, N.; BALE T.L. examining the intersection of sex and stress in modelling neuropsychiatric disorders. **J neuroendocrinol**,. v. 21, p. 415-20, 2009.

GOLD, E. B., et al. Thyroid hormones and thyroid disease in relation to perchlorate dose and residence near a superfund site. **J expo sci environ epidemiol**, v. 23, p. 399-408, 2012.

GOODMAN, Y.; MATTSON M.P. k⁺ channel openers protect hippocampal neurons against oxidative injury and amyloid beta-peptide toxicity. **Brain res**,. v. 706, p. 328-32, 1996.

GOVERMAN, J. Autoimmune t cell responses in the central nervous system. **Nat rev immunol**,. v. 9, p. 393-407, 2009.

- HAYDON, P.G. glia: listening and talking to the synapse. **Nat rev neurosci**,. v. 2, p. 185-93, 2001.
- HEESEN, C, et al. Stress and hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis - a review. **Psychoneuroendocrinology**,. v. 32, p. 604-618, 2007.
- HEMMER, B., et al. Pathogenesis of multiple sclerosis: an update on immunology. **Curr opin neurol**,. v. 15, p. 227-231, 2002.
- HINSON S.R., et al. Aquaporin-4-binding autoantibodies in patients with neuromyelitis optica impair glutamate transport by down-regulating eaat2. **J. Exp. Med.**, v. 205, p. 2437-2481, 2008.
- HOHLFELD, R. Immunologic factors in primary progressive multiple sclerosis. **Mult scler**,. v. 10 suppl 1, p. S16-21; discussion s21-22, 2004.
- HOVELMEYER, N., et al. Apoptosis of oligodendrocytes via fas and tnfr1 is a key event in the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. **J immunol**,. v. 175, p. 5875-5884, 2005.
- INOUE, M., et al. Nlrp3 inflammasome induces chemotactic immune cell migration to the CNS in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Pnas**,. v. 109, p. 10480-10485, 2012.
- JIANG, C.; HADDAD, G.G. differential responses of neocortical neurons to glucose and/or O₂ deprivation in the human and rat. **J neurophysiol**,. v. 68, p. 2165-2173, 1992.
- JOHNSON, J. D. et al. Prior stressor exposure sensitizes LPS-induced cytokine production. **Brain behav immun**,. v. 16, p. 461-476, 2002.
- KARST, A.M., et al. Puma expression is significantly reduced in human cutaneous melanomas. **Oncogene**,. v. 24, p. 1111-6, 2005.
- KOH, D.R., et al. Less mortality but more relapses in experimental allergic encephalomyelitis in CD8^{-/-} mice. **Science**,. v. 256, p. 1210-3, 1992.
- KORN, T., et al, IL-17 and Th17 cells. **Annu. Rev. Immunol**,. v. 27: p. 13, 2009.
- KREUTZBERG, G.W. microglia: a sensor for pathological events in the CNS. **Trends neurosci**,. v. 19, p. 312-8, 1996.

LASSMANN, H. A dynamic view of the blood-brain barrier in active multiple sclerosis lesions. **Ann neurol**,. v. 70, p. 1-2, 2011.

LASSMANN, H. Axonal and neuronal pathology in multiple sclerosis: what have we learnt from animal models. **Exp neurol**,. v. 225, p. 2-8, 2010.

LASSMANN, H. Mechanisms of white matter damage in multiple sclerosis. **Glia**,. v. 62, p. 1816-1830, 2014.

LASSMANN, H. Pathophysiology of inflammation and tissue injury in multiple sclerosis: what are the targets for therapy. **J neurol sci**,. v. 306, p. 167-9, 2011.

LASSMANN, H., BRUCK, W.; LUCCHINETTI, C. Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. **Trends mol med**,. v. 7, p. 115-21, 2001.

LOCK, C., et al. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. **Nat med**,. v. 8, p. 500-8, 2002.

MAGALON, K., et al. Enriched environment promotes adult neural progenitor cell mobilization in mouse demyelination models. **European journal of neuroscience**,. v. 25, 761-771, 2017.

MAGARINOS A. M.; MCEWEN B. S. Experimental diabetes in rats causes hippocampal dendritic and synaptic reorganization and increased glucocorticoid reactivity to stress. **Pnas**,. v. 97, p. 11056-11061, 2000.

MARIGNIER R., et al. Oligodendrocytes are damaged by neuromyelitis optica immunoglobulin g via astrocyte injury. **Brain**,. v. 133, p. 2578-2591, 2010.

MATUSEVICIUS, D., P., et al. Interleukin-17 mrna expression in blood and csf mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. **Mult scler**,. v. 5, p. 101-104, 1999.

MCEWEN, B.S.; A.M. MAGARINOS. Stress and hippocampal plasticity: implications for the pathophysiology of affective disorders. **Hum psychopharmacol**,. v. 16(s1), p. S7-S19, 2001.

MEYER, U.; J. FELDON. Epidemiology-driven neurodevelopmental animal models of schizophrenia. **Prog neurobiol**,. v. 90, p. 285-326, 2010.

- MITRA R.; SAPOLSKY R.M. acute corticosterone treatment is sufficient to induce anxiety and amygdaloid dendritic hypertrophy. **Pnas**,. v. 105, p. 5573–5578, 2008.
- MUNHOZ, C. D., et al. Chronic unpredictable stress exacerbates lipopolysaccharide-induced activation of nuclear factor- κ B in the frontal cortex and hippocampus via glucocorticoid secretion. **J neurosci**,. v. 26, p. 3813-3820, 2006.
- MUNHOZ, C. D., et al. Glucocorticoids exacerbate lipopolysaccharide-induced signaling in the frontal cortex and hippocampus in a dose-dependent manner. **J neurosci**,. v. 30, p. 13690-13698, 2010.
- MURPHY, A.C., et al. Infiltration of th1 and th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Brain behav immun**,. v. 24, p. 641-51, 2010.
- NEUMANN, H. Control of glial immune function by neurons. **Glia**,. v. 36, p. 191-199, 2001.
- OECKINGHAUS A.; HAYDEN M. S.; GHOSH S. Crosstalk in NF- κ B signaling pathways. **Nature immunology**,. v. 12, p. 695-708, 2011.
- PEREZ-NIEVAS, B.G., et al. Corticosterone as a marker of susceptibility to oxidative/nitrosative cerebral damage after stress exposure in rats. **Psychoneuroendocrinology**,. v. 32, p. 703-11, 2007.
- PERUGA, I., et al. Inflammation modulates anxiety in an animal model of multiple sclerosis. **Behav brain res**,. v. 220, p. 20-29, 2011.
- PIEHL, F.; LIDMAN O. Neuroinflammation in the rat-CNS cells and their role in the regulation of immune reactions. **Immunol rev**,. v. 184, p. 212-25, 2001.
- RAMOS-REMUS, C., et al. Prednisone induces cognitive dysfunction, neuronal degeneration, and reactive gliosis in rats. **J investig med**,. v. 50, p. 458–464, 2002.
- RANSOHOFF, R. M. Chemokines and chemokine receptors: standing at the crossroads of immunobiology and neurobiology. **Immunity**. v. 31, p. 711-21, 2009.
- RANSOHOFF, R.M.; KIVISAKK P.; G. KIDD. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. **Nat rev immunol**,. v. 3, p. 569-81, 2003.
- RAO R. P., et al. Glucocorticoids protect against the delayed behavioral and cellular effects of acute stress on the amygdala. **Biol psychiatry**,. v. 72, p. 466–475, 2012.

- RENNO, T., et al. Interferon-gamma in progression to chronic demyelination and neurological deficit following acute eae. **Mol cell neurosci**,. v. 12, p. 376-89, 1998.
- ROLAK, L.A., ifnb in ms. **Neurology**,. v. 47, p. 1110; author reply 1111, 1996.
- SAIJO, K.; GLASS C. K. Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. **Nat rev immunol**,. v. 11, p. 775-87, 2011.
- SANDERS AND SHEKHAR, 1995 Regulation of anxiety by GABAA receptors in the rat amygdala. **Pharmacol Biochem Behav**. 1995 Dec;52(4):701-6.
- SANTOS, E.C.; YOKOTA M.; DIAS N. Multiple sclerosis: study of patients with relapsing-remitting form registered at minas gerais secretary of state for health. **Arq neuropsiquiatr**,. v. 65, p. 885-8, 2007.
- SCHWEINGRUBER, N., et al. Mechanisms of glucocorticoids in the control of neuroinflammation. **J neuroendocrinol**,. v. 24, p. 174-182, 2012.
- SERADA, S., et al. Il-6 blockade inhibits the induction of myelin antigen-specific th17 cells and th1 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Proc natl acad sci u s a**,. v. 105, p. 9041-6, 2008.
- SETHNA, M.P; LAMPSON L.A. immune modulation within the brain: recruitment of inflammatory cells and increased major histocompatibility antigen expression following intracerebral injection of interferon-gamma. **J neuroimmunol**,. v. 34, p. 121-32, 1991.
- SIMMONS, R.D.; WILLENBORG D.O. direct injection of cytokines into the spinal cord causes autoimmune encephalomyelitis-like inflammation. **J neurol sci**,. v. 100, p. 37-42, 1990.
- SKULINA, C., et al. Multiple sclerosis: brain-infiltrating cd8+ t cells persist as clonal expansions in the cerebrospinal fluid and blood. **Proc natl acad sci u s a**,. v. 101, p. 2428-33, 2004.
- SORENSEN, P.S., et al. Nordic trial of oral methylprednisolone as add-on therapy to interferon beta-1a for treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis (normims study): a randomised, placebo-controlled trial. **Lancet neurol**,. v. 8, p. 519-29, 2009.
- SORRELLS, et al. Comparative dna sequence analysis of wheat and rice genomes. **Genome res**,. v. 13, p. 1818-1827, 2003.

- SORRELLS, S.F., et al. The stressed cns: when glucocorticoids aggravate inflammation. **Neuron**,. v. 64, p. 33-9, 2009.
- SOSPEDRA, M.; MARTIN, R. Immunology of multiple sclerosis. **Annu rev immunol**,. v. 23, p. 683-747, 2005.
- SOUSA, N.; CERQUEIRA J.J.; ALMEIDA O. F. Corticosteroid receptors and neuroplasticity. **Brain res rev**,. v. 57, p. 561-70, 2008.
- STEINMAN, L.; ZAMVIL S. How to successfully apply animal studies in experimental allergic encephalomyelitis to research on multiple sclerosis. **Ann neurol**,. v. 60, p. 12-21, 2006.
- STREIT, W.J.; WALTER S.A.; PENNELL N.A.. Reactive microgliosis. **Prog neurobiol**,. v. 57, p. 563-81, 1999.
- SWAAB, D. F., et al. The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. **Ageing res rev**, 2005. 4(2): p. 141-194.
- TZARTOS, J.S., et al. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating t cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. **Am j pathol**,. v. 172, p. 146-55, 2008.
- VIRGIN, C.E., JR., et al. Glucocorticoids inhibit glucose transport and glutamate uptake in hippocampal astrocytes: implications for glucocorticoid neurotoxicity. **J neurochem**,. v. 57, p. 1422-8, 1991.
- VOSKUHL R. R.; GOLD S.M. sex-related factors in multiple sclerosis: genetic, hormonal and environmental contributions. **Nat. Rev. Neurol**,. v. 8, p. 255–263, 2012.
- WEAVER, A., et al. An elevated matrix metalloproteinase (mmp) in an animal model of multiple sclerosis is protective by affecting th1/th2 polarization. **Faseb j**,. v. 19, p. 1668-70, 2005.
- WEI, Y., et al. Effects of glucocorticoid on cyclic nucleotide-gated channels of olfactory receptor neurons. **J otolaryngol head neck surg**,. v. 38, p. 90-95, 2009.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Atlas : multiple sclerosis resources in the world 2008**,. Geneva, 2008. 51 p.

WUST S., et al. Preventive treatment with methylprednisolone paradoxically exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis. **International journal of endocrinology**,. p. 1-8 , 2012.

YU, C.R., et al. Persistence of il-2 expressing th17 cells in healthy humans and experimental autoimmune uveitis. **Eur j immunol**,. v. 41, p. 3495-505, 2011.

ZAMVIL, S.S.; STEINMAN L., diverse targets for intervention during inflammatory and neurodegenerative phases of multiple sclerosis. **Neuron**,. v. 38, p. 685-8, 2003.

ZHANG, G.; GHOSH S., toll-like receptor-mediated nf-kappab activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. **J clin invest**,. v. 107, p. 13-9, 2001.

ZHAO, Z. E CUI L. Easimed: a remote health care solution. **Conf proc ieee eng med biol soc**,. v. 2, p. 2145-2148, 2005.