RAFAELA FLORINDO PESTANA FERRÃO BATALHOTE

**ESTUDOS DA TRANSMISSÃO NEUROMUSCULAR E DO MÚSCULO ESQUELÉTICO EM UM
MODELO EXPERIMENTAL DE ESCLEROSE MÚLTIPLA EM CAMUNDONGOS**

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

São Paulo
2017

RAFAELA FLORINDO PESTANA FERRÃO BATALHOTE

**ESTUDOS DA TRANSMISSÃO NEUROMUSCULAR E DO MÚSCULO ESQUELÉTICO EM UM
MODELO EXPERIMENTAL DE ESCLEROSE MÚLTIPLA EM CAMUNDONGOS**

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora excepcional: Profa. Dra. Rosana
Camarini

Coorientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Oliveira

Versão corrigida. A versão original eletrônica,
encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB
quanto na Biblioteca Digital de Teses e
Dissertações da USP (BDTD).

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)

Florindo Pestana Ferrão Batalhote, Rafaela
Estudos da transmissão neuromuscular e do
músculo esquelético em um modelo experimental de
Esclerose Múltipla em camundongos / Rafaela
Florindo Pestana Ferrão Batalhote; orientadora
Rosana Camarini; coorientadora Antonio Carlos
Oliveira. -- São Paulo, 2017.
69 p.

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

1. Esclerose Múltipla. 2. Encefalomielite
Autoimune Experimental. 3. Transmissão
neuromuscular. 4. Músculo esquelético. I. Camarini,
Rosana, orientador. II. Oliveira, Antonio Carlos,
coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidata: Rafaela Florindo Pestana Ferrão Batalhote

Título da Tese: Estudo da transmissão neuromuscular e do músculo esquelético em um modelo experimental de Esclerose Múltipla em camundongos.

Orientadora Excepcional: Profa. Dra. Rosana Camarini

Coorientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Oliveira

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 **99** nas fls. **03** do livro **09** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Antonio Carlos Oliveira** Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Estudos da condução nervosa, transmissão neuromuscular e contratilidade muscular em um modelo experimental de esclerose múltipla*" do qual participam o(s) aluno(s) **Rafaela Floriano Pestana Ferrão Batalhote**, **Nathália Bernardes Teixeira** a pesquisadora **Gisele Picolo** e a Especialista de Laboratório **Carmem Silvia Moreno Serra**, 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 **13.08.2013, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 19 de agosto de 2013.

Prof. Dr. ANDERSON DE SÁ NUNES
Vice-Coordenador-CEUA- ICB/USP

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

*Dedico esta tese ao meu amorzinho,
meu filho João Victor Pestana
Batalhote, meu combustível diário.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Oliveira pela orientação deste trabalho, por esses anos de convivência, incentivo, apoio, formação e por ter acreditado no meu potencial.

A Profa. Dra. Carolina Demarchi Munhoz pela orientação inicial quanto ao modelo experimental de Esclerose Múltipla e pela orientação junto à FAPESP e CNPq.

A toda equipe do laboratório de dor e sinalização do Instituto Butantan, em especial a Profa. Dra Gisele Picolo e a doutoranda Natália Bernardes Teixeira, que nos ensinaram o modelo de EAE, contribuindo assim para a obtenção dos grupos experimentais, etapa crucial desse projeto.

Ao Prof. Dr. Anselmo Sigari Moriscot e ao doutorando Willian José da Silva pela orientação e auxílio na realização das técnicas morfológicas utilizadas neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Cristofóro Scavone e Profa. Dra. Rosana Camarini pela atuação como orientadores excepcionais.

As secretárias da pós graduação Mônica e Camila que estiveram sempre dispostas a me auxiliar.

A Carmen Silvia Moreno Serra, pelo inestimável auxílio técnico, parceria e amizade.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo: 11/50119-9) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Aos meus irmãos, parte da minha história, pelas conversas e cuidados com meu João, para que me dedicasse a tese. Em especial ao meu irmão Denis Pestana, pela ajuda na formatação de algumas imagens que enriquecerem esse trabalho.

Aos meus pais, Valdir de Souza Pestana e Deisi Aparecida do Rosário Florindo, que embarcaram nesse sonho comigo, me dando apoio para que conseguisse fechar esse ciclo.

Ao meu marido Ronaldo Ferrão Batalhote, meu grande incentivador. Muito obrigado por estar presente, que juntos possamos alçar novos voos.

RESUMO

Batalhote RFPF. Estudos da transmissão neuromuscular e do músculo esquelético em um modelo experimental de Esclerose Múltipla em camundongos. [tese (Doutorado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

A esclerose múltipla (EM) é uma doença desmielinizante que afeta o sistema nervoso central. É característico da doença a presença de um grande número de sinais e sintomas de natureza sensorial e ou motora. Dentre estes a paralisia muscular é o mais grave. No presente trabalho estudos fisiológicos, farmacológicos e morfológicos foram realizados em músculos de animais exibindo paralisia muscular, num modelo de EM conhecido como Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE). A abordagem consistiu de imunizar camundongos (adultos, fêmeas, linhagem C57BL/6) com a glicoproteína oligodendrocítica da mielina (sigla MOG do inglês) adicionada de adjuvante completo de Freund (ACF) e de toxina pertussis (TP). Animais assim manipulados constituíram o grupo EAE. Dois outros grupos de animais foram estabelecidos: a) animais controles; b) animais que receberam ACF+TP mas não receberam a MOG. Os animais foram pesados diariamente e avaliados quanto a alterações motoras usando uma escala de 0 a 3 graus. Experimentos miográficos foram realizados in vitro utilizando a preparação isolada nervo isquiático-músculo extensor longo dos dedos (ELD) ou o próprio músculo isolado. Contrações indiretas isoladas (geradas a 0.2 Hz) e contrações indiretas tetânicas (geradas a 75, 100, 150, 175, 200 Hz por 1 a 2 segundos) foram estudadas na ausência e presença do bloqueador neuromuscular pancurônio. Contrações diretas também foram geradas a 0.2 Hz (contrações isoladas) ou 75, 100, 150 e 200 Hz (contrações tetânicas). Estudos morfológicos foram realizados para medir a área de secção transversa e atividade ATPásica das fibras musculares. Isto permitiu avaliar a proporção de tipos de fibras musculares (I, IIA e IIB) no músculo ELD em animais controles, ACF+TP e EAE. Nos animais EAE a maior incidência de animais com o grau mais alto de doença ocorreu por volta do 15º dia pós-imunização, incidência que entrou em remissão parcial após esse dia. Comparando os 3 grupos de animais, os seguintes resultados foram obtidos: a) nos animais EAE houve um decréscimo da massa corpórea dos camundongos e da massa do músculo ELD; b) em músculos de animais EAE, as contrações indiretas e diretas, tanto isoladas como tetânicas, foram menores que as correspondentes dos animais controles. Em adição, os músculos dos animais EAE se mostraram mais resistentes à fadiga induzida pela estimulação tetanizante do que músculos de animais controles; c) quanto a efeitos do pancurônio as CI_{50} relativas ao bloqueio das contrações isoladas não diferiram comparando animais controle, ACF+TP e EAE. No tocante a contrações tetânicas, os músculos de animais EAE se mostraram mais resistentes ao pancurônio que os músculos de animais controle e ACF+TP. Nos músculos de animais EAE a área de secção transversa das fibras musculares foi menor que em músculos de animais controle. Em adição, nos animais EAE houve uma troca ("shift") de tipos de fibras musculares de IIB para IIA. Todas as diferenças acima apontadas foram significantes a um nível de 5%. Conclui-se que as alterações encontradas nos animais EAE refletem alterações não só do processo de transmissão neuromuscular mas também do próprio músculo.

Palavras-chave: Esclerose Múltipla. Encefalomielite Autoimune Experimental. Transmissão neuromuscular. Músculo esquelético.

ABSTRACT

Batalhote RRFP. Studies of neuromuscular transmission and skeletal muscle in a Multiple Sclerosis model in the mouse. [thesis (Ph.D thesis in Pharmacology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

Multiple sclerosis (MS) is a demyelinating disease that affects the Central Nervous System. It is characteristic of the disease the presence of a number of signs and symptoms, either of a sensorial or motor nature. Among these, muscle paralysis is the most important handicap. In the present work, physiological, pharmacological and morphological studies were performed in muscles of animals displaying muscle paralysis, in a model of MS known as experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). The approach consisted in immunizing mice (adult, female, C57BL6 strain) with myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) mixed with the complete Freund adjuvant (CFA) and pertussis toxin (PT). Two types of controls were employed: a) naïve animals; b) animals receiving only CFA+PT. The animals were daily weighed and evaluated as regards the motor impairment using a conventional disease score of four levels (0 to 3). Myographical experiments were performed in vitro using the isolated sciatic nerve-extensor digitorum longus (EDL) muscle preparation or the isolated muscle preparation. Indirect twitches (generated at 0.2 Hz) and tetanic contractions (generated at 75, 100, 150, 175, 200 Hz for 1-2 seconds) were studied in the absence or presence of pancuronium, a neuromuscular blocker. Direct contractions were also evoked at 0.2 Hz (twitches) or 75, 100, 150 and 200 Hz (tetanic contractions). Morphological studies were performed to measure the cross sectional area and the ATPase activity of the muscle cells. This permitted to evaluate the proportion of fiber types (I, IIA and IIB) in the EDL muscle in naïve, CFA+PT and EAE animals. In EAE animals the average disease score attained a maximum value *ca.* the 15th day post-immunization and then partially remitted. Comparing the three groups of animals the following results were obtained: a) a decrease in body and EDL muscle mass in EAE animals; b) in muscles of EAE animals, indirect and direct twitches and tetanic contractions were smaller than in naïve animals. Additionally, muscles from EAE animals were more resistant to the fatigue induced by tetanic stimulation than muscles from naïve animals; c) as regards pancuronium effects, its IC₅₀ for the block of indirect twitches did not differ comparing naïve, CFA+TP and EAE animals. Regarding tetanic contractions, muscles of EAE animals were more resistant to pancuronium than muscles of naïve and CFA+TP animals. In muscles from EAE animals the cross-sectional area of the fibers was smaller than in muscles from naïve animals. Furthermore, in EAE animals there was a shift of muscle fiber types from IIB to IIA, compared to muscles of naïve animals. All the differences pointed above were significant at the 5% level. It is concluded that the alterations found in EAE animals reflect changes not only in the process of neuromuscular transmission but also changes in the muscle itself.

Keywords: Multiple Sclerosis. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. Neuromuscular transmission. Skeletal muscle.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Prevalência mundial da EM.	17
Figura 2- Quadro representativo dos padrões de desmielinização na EM	21
Figura 3- Diferentes tipos clínicos da EM.	23
Figura 4- Aparato experimental para os registros de contrações isoladas e tetânicas.	31
Figura 5- Média diária ($\pm$ erro padrão da média) dos graus de avaliação motora no total dos animais utilizados	37
Figura 6- Evolução da massa corporal dos animais até cinquenta dias pós-imunização	38
Figura 7- Massa corporal mensurada no dia do experimento miográfico de animais do grupo controle, ACF+TP e EAE.	39
Figura 8- Massa do músculo ELD.....	39
Figura 9- Contrações indiretas isoladas registradas na ausência e presença de pancurônio em animal grau 3 de EAE	40
Figura 10- Força de contração muscular indireta isolada	41
Figura 11- Curvas concentração-resposta do efeito bloqueador do pancurônio sobre a contração muscular indireta isolada	42
Figura 12- Gráfico de barras representativo das CI_{50} de pancurônio relativas ao bloqueio da contração indireta isolada.....	43
Figura 13- Contrações indiretas tetânicas em diferentes frequências de estimulação na ausência de pancurônio	44
Figura 14- Amplitude máxima indireta tetânica em diferentes frequências de estimulação .	45
Figura 15- Manutenção do tétano 1 segundo após a instalação da amplitude máxima em diferentes frequências de estimulação	46
Figura 16- Contrações indiretas tetânicas, em diferentes frequências de estimulação, na presença de pancurônio (0,05 μ M).	47
Figura 17- Amplitude máxima indireta tetânica em diferentes frequências de estimulação, na presença de pancurônio (0,05 μ M).....	48
Figura 18- Manutenção da contração tetânica indireta 1 segundo após a instalação da amplitude máxima em diferentes frequências de estimulação na presença de pancurônio (0,05 μ M).....	49
Figura 19- Força da contração muscular direta isolada	50
Figura 20- Contrações diretas tetânicas em diferentes frequências de estimulação.....	51
Figura 21- Amplitude máxima direta tetânica em diferentes frequências de estimulação	51
Figura 22- Manutenção da contração direta tetânica mensurada 2 segundos após a instalação da amplitude máxima em diferentes frequências de estimulação.....	52
Figura 23- Imagens representativas das fibras musculares que compõem o músculo ELD, estudadas pela técnica de atividade da enzima ATPase miofibrilar (pH 10,3).	53
Figura 24- Distribuição porcentual dos tipos de fibras musculares.....	54

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1-</i> Número de animais imunizados, incidência porcentual de animais com EAE e dia de início dos sinais clínicos da EAE	36
<i>Tabela 2-</i> Tipos e áreas de secção transversa das fibras musculares do ELD.	53

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Aspectos fisiológicos da transmissão neuromuscular.....	12
1.2 Acoplamento excitação-contração da musculatura esquelética.....	13
1.3 Músculos rápidos e lentos: tipos de fibras musculares	14
1.4 Aspectos farmacológicos da transmissão neuromuscular	14
1.5 Esclerose Múltipla	16
1.5.1 Epidemiologia	16
1.5.2 Fatores ambientais e genéticos.....	17
1.5.3 Anatomia Patológica	19
1.5.4 Aspectos Clínicos da EM.....	21
1.5.5 Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE)	23
2 OBJETIVO	26
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 Indução da EAE	27
3.2 Avaliação da evolução da doença	29
3.3 Estudos miográficos	29
3.3.1 Retirada da preparação nervo-músculo e do músculo ELD	29
3.3.2 Registro da contração muscular	30
3.4 Bloqueador neuromuscular utilizado	32
3.5 Estudo dos tipos e da área de secção transversa das fibras musculares do ELD.....	33
3.6 Análise estatística	34
4 RESULTADOS	36
4.1 Avaliação motora dos animais imunizados.....	37
4.2 Evolução da massa corporal dos animais utilizados.....	37
4.3 Massa corporal dos animais no dia do experimento	38
4.4 Massa do músculo ELD.....	39
4.5 Estudos miográficos	40
4.5.1. Contrações indiretas isoladas.....	40
4.5.1.1 Dados na ausência de pancurônio	41
4.5.1.2 Dados na presença de pancurônio	41
4.5.2 Contrações indiretas tetânicas	43
4.5.3 Contrações diretas isoladas.....	49
4.5.4 Contrações diretas tetânicas	50
4.6 Estudos morfológicos	52
5 DISCUSSÃO	55
5.1 Otimização do processo de indução da EAE no presente trabalho.....	55
5.2 Evolução clínica dos animais EAE no presente trabalho.	56
5.3 Massa corporal e massa do músculo ELD nos animais EAE	59
5.4 Contrações isoladas indiretas e diretas.....	60
5.5 Efeitos do pancurônio sobre as contrações isoladas indiretas.	60
5.6 Contrações tetânicas indiretas e diretas.....	61
5.7 Efeitos do pancurônio sobre as contrações tetânicas indiretas.	63
5.8 Morfologia celular do músculo ELD	64
6 CONCLUSÕES.....	65
REFERÊNCIAS*	66

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos fisiológicos da transmissão neuromuscular

A junção neuromuscular é constituída por um elemento pré-sináptico (terminação nervosa motora), um elemento pós-sináptico (placa motora), separados por um espaço denominado fenda sináptica (37, 38, 39).

A transmissão neuromuscular envolve diferentes etapas que se iniciam com a chegada de um potencial de ação à terminação nervosa motora culminando na contração muscular. De maneira resumida, na terminação nervosa motora ocorrem a síntese, estocagem e liberação de acetilcolina. Já na placa motora ocorre ativação, pela acetilcolina, dos receptores nicotínicos localizados nessa placa, gerando despolarização (potencial de placa terminal) que por sua vez produz um potencial de ação muscular, o qual leva à contração da musculatura esquelética pelo processo de acoplamento excitação-contração.

Essas etapas serão abordadas de maneira mais detalhada abaixo (37, 38, 39).

A síntese de acetilcolina se dá a partir da colina que é capturada ativamente pela terminação nervosa motora. No interior da terminação a colina é acetilada num processo catalisado pela colina-acetil-transferase, enzima de localização citoplasmática. A acetilcolina resultante é estocada em vesículas sinápticas por um processo ativo de captura de acetilcolina localizado na membrana vesicular (37, 38, 39)

A liberação de acetilcolina ocorrerá em diferentes etapas que se seguem a um potencial de ação que alcança a terminação nervosa motora por um potencial de ação. Este constitui uma onda auto-propagada de despolarização, que serve de estímulo para a abertura de canais de cálcio voltagem dependentes e consequente aumento da concentração de cálcio intracelular (37, 38, 39).

A presença do cálcio na terminação favorece a fusão da membrana da vesícula sináptica com a membrana axonal, levando a liberação de acetilcolina estocada na vesícula, processo conhecido por exocitose. Essa fusão ocorre devido à interação de proteínas especializadas, que estão presentes na membrana pré-sináptica ("SNAPs": do inglês synaptosome-associated proteins) e na membrana das vesículas sinápticas ("VAMPs": do inglês vesicle-associated membrane proteins). Essas proteínas interagem sob o comando do cálcio (37, 38, 39).

Cada vesícula contém cerca de 10.000 moléculas de acetilcolina, o que corresponde a

um quantum de acetilcolina. O potencial de ação neural libera cerca de 100 vesículas por impulso. A acetilcolina liberada interage com receptores colinérgicos, ionotrópicos, do tipo nicotínico, localizados na membrana pós- sináptica (placa motora). Uma vez ativados pela acetilcolina, esses receptores geram um fluxo de corrente despolarizante. Esse fluxo desencadeia o potencial de placa motora, um potencial excitatório pós- sináptico que ativa canais de sódio voltagem dependentes. O potencial de ação resultante dessa ação se auto-propaga a partir da placa motora e vai desencadear a contração muscular, através do processo conhecido como acoplamento excitação-contração (37, 38, 39).

1.2 Acoplamento excitação-contração da musculatura esquelética

O potencial de ação muscular leva a contração através do chamado acoplamento excitação-contração. O processo se inicia pela penetração do potencial de ação para o interior da fibra muscular através do sistema de túbulos “T”. A membrana dos túbulos T contém receptores sensíveis à voltagem (receptores de di-hidropiridina, ou receptores DHP). Esses receptores estão ligados mecanicamente a receptores de rianodina (RyR), que são canais de liberação de Ca^{2+} presentes no retículo sarcoplasmático adjacente aos túbulos T. Uma vez os receptores RyR ativados, a quantidade de Ca^{2+} aumenta no citosol, levando ao processo de contração muscular, descrito abaixo (37, 38, 39).

O processo de contração muscular envolve um complexo de proteínas: troponina-tropomiosina-actina-miosina. No estado de repouso do músculo, também chamado de posição “desligada”, a tropomiosina (polímero proteico alongado) se enrola em torno dos filamentos de actina, cobrindo parcialmente os sítios de ligação da miosina na actina. Para que ocorra a contração muscular é necessário, que o Ca^{2+} presente no citosol, se ligue a troponina, o que desloca a tropomiosina, afastando-a completamente dos sítios de ligação na actina. Nessa posição “ligada” as cabeças de miosina formam pontes cruzadas e executam movimentos de força, movendo o filamento de actina, o que leva à contração muscular (37, 38, 39).

Os ciclos de contração irão se repetir enquanto os sítios de ligação estiverem expostos. O relaxamento muscular ocorre após as concentrações de Ca^{2+} diminuírem no citosol pela ação da bomba de Ca^{2+} ATPase, presente no retículo sarcoplasmático. A diminuição da concentração de Ca^{2+} no citosol, faz com que o mesmo se desligue da

troponina, permitindo assim que a tropomiosina retorne a posição anterior, voltando a cobrir a maior parte dos sítios de ligação da miosina na actina o que promove o relaxamento muscular (37, 38, 39).

1.3 Músculos rápidos e lentos: tipos de fibras musculares

Os músculos diferem na sua velocidade de contração, sendo subdivididos em músculos rápidos e lentos. Essas características decorrem do tipo de fibra muscular que compõe o músculo. Existem diferentes tipos de fibras musculares: tipo I (lenta), tipo IIB (rápida) e tipo IIA (intermediária). São características adicionais das fibras lentas, tipo I: alta capacidade oxidativa, baixa capacidade glicolítica, baixa atividade ATPásica, alta resistência à fadiga e baixa propensão à atrofia. São características adicionais das fibras rápidas, tipo IIB: baixa capacidade oxidativa, alta capacidade glicolítica, alta atividade ATPásica, baixa resistência à fadiga e alta propensão à atrofia. As fibras intermediárias (IIA) tem tanto atividades glicolítica como oxidativas, em grau intermediário entre as tipo I e tipo IIB. Estas fibras IIA apresentam propriedades igualmente intermediárias no tocante a resistência à fadiga e a propensão à atrofia. É interessante apontar que as fibras musculares esqueléticas apresentam plasticidade, isto é, podem mudar de características dependendo das circunstâncias. Por exemplo, na imobilidade crônica, concomitante à atrofia muscular pode ocorrer mudança na proporção do número de fibras tipo I para fibras tipo II (“shift”) (40, 41).

1.4 Aspectos farmacológicos da transmissão neuromuscular

Com relação à farmacologia da junção neuromuscular, as drogas ou fármacos atuantes podem ter uma atividade bloqueadora ou facilitadora da transmissão neuromuscular (42).

Os bloqueadores e seus mecanismos de ação podem atuar na terminação nervosa ou na placa motora. Os que atuam na terminação nervosa podem interferir na síntese, na estocagem ou na liberação de acetilcolina. Já os que atuam na placa motora interagem com os receptores nicotínicos de maneira competitiva ou despolarizante (42).

Um exemplo de fármaco para cada um dos mecanismos mencionados será apontado. Assim, entre os fármacos que atuam na síntese de acetilcolina, pode-se mencionar os

hemicolíneos, que bloqueiam a captura ativa de colina pela terminação nervosa motora, levando a diminuição da síntese daquele neurotransmissor (42).

Quanto à estocagem de acetilcolina, o vesamicol bloqueia o transportador de acetilcolina presente na membrana vesicular, impedindo o armazenamento da acetilcolina sintetizada. Já com relação à diminuição da liberação de acetilcolina, as toxinas botulínicas são o exemplo principal desse mecanismo de ação, ao interferirem com a exocitose de acetilcolina, em virtude da sua atividade lítica sobre as proteínas de exocitose (42).

Com relação aos fármacos que atuam na placa motora, o bloqueio pode ser exercido por meio de dois mecanismos: despolarizante e competitivo. O bloqueio despolarizante ocorre quando o fármaco interage com o receptor nicotínico como agonista, levando a uma despolarização prolongada, que resulta em um relaxamento muscular. A succinilcolina é um exemplo de fármaco atuante por esse mecanismo. O bloqueio competitivo ocorre pela ligação de um bloqueador no receptor nicotínico muscular impedindo a ativação deste receptor pela acetilcolina (42).

Neste trabalho um bloqueador competitivo, o pancurônio, foi utilizado. Em sendo assim aspectos adicionais sobre bloqueadores competitivos da junção neuromuscular, no geral, e com relação ao pancurônio, em particular, serão abordados.

Do ponto de vista molecular, o bloqueador competitivo da junção neuromuscular ocupa, de maneira reversível, os sítios de reconhecimento de acetilcolina existentes no receptor nicotínico presente na placa motora (42). Este mecanismo, de atuação pós-sináptica, é o principal desses bloqueadores competitivos, mas não é o único. Existem fortes evidências de que tais bloqueadores também podem ter atuação pré-sináptica, bloqueando receptores nicotínicos presentes na terminação nervosa motora, receptores que facilitam a liberação de acetilcolina (42).

Esta visão se confirma, no caso do pancurônio. Isso porque estudo anterior deste laboratório, de eletrofisiologia celular, mostrou que em adição à sua clássica ação pós-sináptica competitiva, o pancurônio exerce ação pré-sináptica de significativa magnitude (43). Ainda com relação ao pancurônio, num outro estudo deste laboratório, utilizando miografia, in vitro, procurou-se quantificar o efeito diferencial sobre contrações tetânicas e isoladas (44). Este efeito consiste de que é típico, para os bloqueadores competitivos da junção neuromuscular, que a contração tetânica seja bloqueada numa concentração menor

do que aquela que bloqueia a contração isolada. Nesse contexto, em estudo anterior constatou-se que as concentrações de pancurônio que bloqueiam as contrações tetânicas são cerca de duas vezes menores que as concentrações que bloqueiam as contrações isoladas (44).

1.5 Esclerose Múltipla

A esclerose múltipla (EM) é a mais comum das doenças inflamatórias desmielinizantes, constituindo a causa mais frequente de incapacidade neurológica permanente não traumática em adultos jovens, na Europa e na América do Norte. Estima-se que afete mais de 2,5 milhões de indivíduos em todo o mundo (1,2).

1.5.1 Epidemiologia

A EM acomete mais frequentemente indivíduos, entre os 15 e 45 anos, tendo seu ponto de maior incidência por volta dos 30 anos (3, 4). A EM é mais comum em mulheres (proporção de 2 para 1) (5) e em indivíduos da raça branca. A prevalência da EM está acima de 100 casos para cada 100.000 habitantes em áreas de alto risco, como no Canadá e Estados Unidos; e de 5 a 20 casos para cada 100.000 habitantes no Japão, assim como em outras partes da Ásia, África Equatorial e Oriente Médio (4, 6, 7).

Figura 1 - Prevalência mundial da EM.

Fonte: (7).

No Brasil, dados de prevalência da EM referentes à região Sudeste, nas cidades de São Paulo, Botucatu e Belo Horizonte, indicam 15, 17 e 20 casos, para cada 100.000 habitantes, nos anos de 1997, 2000 e 2001, respectivamente (3). Em termos mundiais a prevalência mais alta da EM se encontra nas Ilhas de Órcades, localizadas ao norte da Escócia, correspondendo a 250 casos para cada 100.000 habitantes (6, 7).

1.5.2 Fatores ambientais e genéticos

Aparentemente, a susceptibilidade à EM envolve fatores tanto ambientais quanto genéticos. Os indivíduos que migram depois dos 15 anos de idade de uma área de alto risco para regiões de baixo risco ou vice versa, transportam o risco nativo de contrair a EM, sugerindo que a exposição durante a adolescência a determinado fator ambiental, talvez de origem viral, pode influenciar na determinação da suscetibilidade do indivíduo à EM (8).

Os estudos genéticos mostram que o risco de EM é 10-20 vezes maior em parentes de primeiro grau do que na população em geral. A taxa de concordância em gêmeos monozigóticos (idênticos) é de 30-35% e de apenas 2-5% para gêmeos dizigóticos (fraternos) e outros irmãos. Genes que tem recebido uma especial atenção na predisposição à doença são aqueles relacionados com o sistema imunológico. Em particular genes que codificam

elementos do complexo trimolecular (MHC-Ag-TCR), siglas cujos significados provindos do inglês são: Major Histocompatibility Complex (MHC), Antigen (Ag) e T cell receptor (TCR) (8).

Fatores imunológicos, genéticos e ambientais (tais como os vírus) são considerados possíveis participantes na etiologia da EM. Uma hipótese sugerindo a participação viral na etiologia da EM postula que as células T reativas da mielina tornam-se ativadas na periferia pela apresentação de epitopos virais capazes de reações cruzadas, portanto que se assemelham a auto-antígenos (mimetismo molecular). Uma vez ativadas, essas células T podem infiltrar o SNC e iniciar uma cascata autoimune patogênica, levando à destruição da mielina. Alternativamente, um vírus pode atuar sobre os oligodendrócitos, levando a exposição de fragmentos de mielina previamente inacessíveis. Esses auto-peptídeos seriam capazes de ativar células T reativas à mielina, amplificando os processos inflamatórios destrutivos no Sistema Nervoso Central (SNC). Neste cenário, uma infecção transiente poderia ser suficiente para desencadear a EM, já que a persistência viral não é necessária para promover a progressão da doença (8).

Numerosos vírus foram considerados como possivelmente associados causalmente com a EM, entre eles os vírus Epstein Barr (EBV), Citomegalovírus (CMV), Hepatite B (HBV), Herpes vírus (HV), Herpes vírus 6 ou 7 humano, vírus do Sarampo e Corona vírus. Os vírus da raiva, do sarampo e o herpes vírus foram isolados de tecidos cerebrais de portadores da EM, mas nenhuma ligação clara deles com o desencadeamento da EM foi observada (8,9).

Apesar de intensa pesquisa na área, a etiologia da EM ainda não está plenamente estabelecida. A hipótese de maior aceitação é que a EM é uma doença mediada imunologicamente pelas células T. Na EM, as células T reativas a mielina são ativadas na periferia. Uma vez ativadas, essas células aumentam em número e trafegam para o SNC. A migração através de uniões estreitas do endotélio da barreira hematoencefálica é promovida pela expressão de moléculas de adesão e liberação de citocinas pró-inflamatórias pelas células T ativadas. No SNC, as células T reativas para mielina se reativam novamente quando as mesmas encontram o epítipo específico da mielina apresentado pelas células apresentadoras de antígenos, células microgliais ou macrófagos perivasculares. As células T reativadas irão produzir localmente citocinas inflamatórias, como o interferon gama (IFN- γ) e o fator de necrose tumoral (TNF α), levando ao aumento de moléculas MHC classe II nos astrócitos, microglia e moléculas de adesão no endotélio da barreira hematoencefálica. Isto

irá facilitar o influxo de células T, células B e macrófagos, contribuindo para a amplificação da resposta inflamatória imune. A desmielinização será o resultado final do círculo vicioso de eventos (10).

1.5.3 Anatomia Patológica

A EM é tipicamente caracterizada pela presença de placas desmielinizantes focais na substância branca do Sistema nervoso Central (SNC). Essas placas variam, em tamanho, de 1 a 2 mm até vários centímetros e são geralmente localizadas ao redor de veias e vênulas. Áreas do SNC com alta densidade vascular apresentam mais placas do que outras regiões, como a substância branca subcortical e periventricular do encéfalo, nervos ópticos e quiasma óptico, pedúnculo cerebelar e a coluna lateral da medula espinal (6, 11).

As placas de EM são lesões focais da substância branca facilmente identificáveis, caracterizadas por desmielinização primária, lesão axonal de extensão variável e formação de cicatriz glial reativa (11).

Uma placa pode conter lesões ativas (iniciais e tardias) e inativas (completamente desmielinizadas), estas últimas podendo estar ou não em processo de remielinização (12).

A lesão ativa clássica é definida como aquela onde se encontram macrófagos ativados contendo resíduos de bainha de mielina, fagocitados durante o processo de desmielinização (13). No entanto outras classificações foram propostas para a identificação de lesões ativas, dentre elas a infiltração do tecido por células inflamatórias (linfócitos T e macrófagos), linfócitos B e células microgliais expressando marcadores de ativação; ou a presença de macrófagos contendo lipídios neutros reativos ao “oilred”, um corante para lipídios (14).

Existe uma sequência temporal na degradação de mielina no interior dos macrófagos. Isto pode ser utilizado no sentido de classificar as lesões ativas em iniciais e tardias (15).

Assim, nas lesões iniciais observa-se que quando ocorre lesão da mielina, esta é ingerida pelo macrófago e o lisossomo dessa célula inicialmente contém produtos de degradação que incluem todos os componentes da bainha de mielina, entre os quais as proteínas minoritariamente presentes nessa bainha, como a glicoproteína oligodendrocítica da mielina (MOG) ou a glicoproteína associada à mielina (MAG). Ainda, as lesões iniciais de EM possuem macrófagos expressando a proteína relacionada à mielóide (MRP14), um

membro da família S100 de proteínas ligantes de cálcio e a proteína 27E10, ambas constituindo marcadores distintos de ativação e diferenciação do macrófago (16).

A reatividade para proteínas minoritárias da mielina é perdida em torno de 2 dias pós lesão, enquanto nas lesões ativas tardias encontram-se durante 6 a 8 dias, as proteínas majoritárias da mielina, como a proteína proteolipídica (PLP) e a proteína básica da mielina (PBM). Uma lesão é considerada inativa quando não se encontram nem proteínas minoritárias e nem majoritárias da mielina; já os macrófagos marcados por PAS (Periodic Acid Schiff) podem persistir ainda por até 6 meses na lesão. A densidade celular nas lesões inativas é baixa, devida à grande perda de oligodendróцитos (16).

Nas lesões em remielinização nota-se a presença de bainhas de mielina curtas, delgadas e organizadas de maneira irregular. Essas lesões mostram imunorreatividade para MAG e CNPase (2'3' nucleotídeo cíclico 3' fosfodiesterase) maior do que para MOG e PLP. Os macrófagos PAS positivos podem ainda estar presentes (16). Como descrito acima a EM é uma doença profundamente heterogênea, onde uma placa de desmielinização pode apresentar diferentes padrões de lesões. Baseado nisso, os neuropatologistas descreveram quatro padrões imunopatológicos de desmielinização, presentes nas lesões ativas iniciais.

Esses padrões estão relacionados com prováveis mecanismos patogênicos envolvidos na doença. Os padrões variam de acordo com a localização da placa, a extensão da sobrevivência do oligodendrócito, grau de desmielinização, grau de remielinização, ativação ou não do complemento e expressão de proteínas da mielina. Segue abaixo quadro explicativo desses padrões (3, 17).

Figura 2 - Quadro representativo dos padrões de desmielinização na EM

Desmielinização mediada por macrófago	Inflamação induzida por células T com ativação macrofágica e microglial. Produtos tóxicos de macrófagos ativados levam a destruição da mielina.
Desmielinização mediada por anticorpo	Destruição da mielina provocada por inflamação em razão da ativação do macrófago e microglia com mediação do complemento
Oligodendrogliopatia distal	Vasculite dos pequenos vasos por inflamação pelos linfócitos T com isquemia secundária que lesa a mielina. Possível causa viral ou metabólica.
Grande perda do oligodendrócito	Inflamação mediada por linfócitos T com ativação dos macrófagos e alteração metabólica local com alteração genética do oligodendrócito.

Deve-se adicionar que na EM, as alterações estruturais não se restringem somente à substância branca. Assim, a substância cinzenta também pode ser afetada, como já demonstrado pela técnica de ressonância magnética que detecta atrofia da substância cinzenta em um estágio precoce da doença, inclusive precedendo lesões da substância branca nuclear, (18). Ainda como informação adicional deve se mencionar que já é bem estabelecido que a EM não é somente uma doença inflamatória, mas é também uma doença neurodegenerativa, evidenciada por transecção axonal e lesão neuronal (19, 20).

1.5.4 Aspectos Clínicos da EM

A doença pode se instalar com um único sintoma ou ser polissintomática, iniciando de forma abrupta ou insidiosa. Alguns pacientes podem apresentar sintomas severos e outros simplesmente não necessitarem de atenção médica por meses ou anos, por apresentarem sintomas mais sutis. Um dos principais sinais e sintomas motores da EM é a fraqueza muscular dos membros superiores e inferiores, que se manifesta como uma perda da força muscular, destreza, fadiga e distúrbios da marcha. Frequentemente essa fraqueza vem acompanhada de sinais de comprometimento do sistema piramidal, como espasticidade, hiperreflexia e presença do sinal de Babinski. Por volta de 30% dos pacientes apresentam espasticidade. Já a fadiga muscular está presente em 90% dos casos, podendo durar horas, dias ou meses (6).

Entre os sinais e sintomas sensoriais presentes na EM, a dor é considerada um sinal comum, acometendo cerca de 50% dos pacientes. A dor pode se localizar em qualquer região do corpo e pode mudar de localização ao longo do tempo. Os pacientes também relatam parestesias (conjunto de sensações alteradas como formigamento, picadas, agulhadas e dormências). Essas alterações sensoriais podem durar de semanas a meses e tem caráter assimétrico, podendo afetar um ou mais membros (3).

Na maioria dos casos, a EM se manifesta por meio de surtos (que correspondem ao aparecimento ou acentuação de sinais e sintomas neurológicos) que se intercalam com períodos de remissão.

A EM apresenta diferentes formas clínicas, a maioria incluindo surtos e remissões. Os surtos na EM são definidos como episódios de distúrbio neurológico, decorrentes de processo inflamatório e desmielinizante, com duração de no mínimo 24 horas. Os pacientes também podem apresentar pseudosurtos, que são episódios transitórios de piora neurológica (flutuação dos sinais e sintomas) resultantes de infecção, fadiga, estresse, febre e aumento de sensibilidade ao calor. As remissões são definidas como episódios onde os sinais e sintomas diminuem ou desaparecem (3, 6).

Sentindo a necessidade de chegar a um consenso quanto aos tipos clínicos da EM, a Sociedade Nacional de Esclerose Múltipla dos EUA, reuniu em 1996 clínicos e pesquisadores com essa finalidade, tendo a EM sido classificada em quatro tipos clínicos:

- a) remitente-recorrente (RR): Por volta de 85 a 90% dos casos de EM apresentam esse tipo clínico. A EM-RR evolui com surtos, cujos sintomas ocorrem de maneira súbita com recuperação total ou com sequelas. O intervalo entre os surtos pode durar 30 dias ou mais, onde a doença se mantém estável, sem progressão (3, 6) (Figura 3A, EMRR).
- b) secundariamente-progressiva (SP): A EM-SP se caracteriza por uma fase precedente de recorrência e remissão (forma remitente-recorrente) seguida de progressão dos déficits sem novos surtos ou com surtos subjacentes (forma secundariamente progressiva com surtos), havendo progressão dos déficits entre os surtos. Geralmente os pacientes evoluem para essa forma após 20 anos de doença (3, 6) (Figura 3B, EMSP).
- c) primariamente-progressiva (PP): Este tipo clínico é responsável por 15% dos casos. A EM-PP se caracteriza desde o início da doença pela ausência de surtos, mas com progressão dos déficits, evoluindo, entretanto, com períodos de estabilização ou mesmo discreta

melhora. Comparada a EM-RR, a EM-PP inicia mais tarde, em média com 40 anos, e a incapacidade se desenvolve mais rapidamente (3, 6) (Figura 3C, EMPP).

d) Progressiva-recorrente (PR): A EM-PR se caracteriza desde o início de modo progressivo, intercalada por surtos definidos, com ou sem recuperação total dos surtos; no intervalo dos surtos continua a progressão (3, 6) (Figura 1D, EMPR).

Figura 3 - Diferentes tipos clínicos da EM.

Fonte: (6).

Abreviaturas: EMRR: Esclerose Múltipla Remitente Recorrente (A); EMSP: Esclerose Múltipla Secundariamente Progressiva (B); EMPP: Esclerose Múltipla Primariamente Progressiva (C); EMPR: Esclerose Múltipla Progressiva Recorrente (D). Detalhes adicionais no texto.

1.5.5 Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE)

O termo Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE) se refere a um grupo de modelos animais de EM. Esses modelos são empregados com o objetivo de estudar os mecanismos envolvidos na fisiopatologia e tratamento da EM (21).

Os primeiros experimentos realizados para se obter um modelo experimental de EM consistiram de aplicar uma emulsão de tecidos cerebrais em coelhos, o que levava à paralisia desses animais (22). Em continuidade a essa linha de experimentação uma emulsão de tecidos cerebrais de coelhos saudáveis foi administrada em macacos. Isto causou lesões

desmielinizantes e infiltrados perivasculares no cérebro e medula espinal desses animais (23). Notou-se que a capacidade da emulsão de induzir a doença nos macacos estava relacionada ao conteúdo de mielina presente na emulsão. Essa foi uma primeira demonstração do envolvimento da mielina com a indução da doença, surgindo o primeiro modelo de EAE (24).

Esses experimentos foram pioneiros quanto à indução de EAE, porém apresentavam a desvantagem de consumir muito tempo, já que eram necessárias múltiplas injeções (até 85 por animal) em um período que poderia se estender por até 1 ano (24). Essa questão foi resolvida quando o processo foi acelerado pela combinação de extratos cerebrais com o adjuvante de Freund. Essa combinação induziu a doença com somente uma injeção (25).

Desde então a EAE tem sido induzida em uma variedade de espécies de mamíferos, incluindo ratos, camundongos, porcos, coelhos, ovelhas, cabras e primatas (26). Contudo, a histopatologia e curso clínico da EAE variam significativamente dependendo da linhagem genética dos animais, da fonte do material antigênico e do modo de aplicação do antígeno, o que reflete a heterogeneidade da doença em humanos (27).

Na atualidade os modelos de indução da EAE podem ser divididos em EAE ativa ou passiva. A EAE ativa é induzida pela aplicação de proteínas encefalitogênicas, como a proteína oligodendrocítica da mielina (MOG) ou a proteína proteolipídica (PLP), emulsificadas em adjuvante de Freund e *Mycobacterium tuberculosis* H37RA, suplementadas por toxina pertussis (28).

Por outro lado, na EAE passiva os animais recebem transferência adotiva de linfócitos Th1 CD4⁺ reativos para mielina. Neste procedimento isolam-se células T do baço ou do linfonodo de camundongos sensibilizados previamente contra peptídeos presentes no SNC. Essas células T encefalitogênicas são diferenciadas em CD4⁺ pela aplicação de citocinas específicas associada a uma cocultura de células apresentadoras de antígeno. Essas células MHC classe 2 são carregadas com peptídeos da mielina, para estimular as células CD4⁺ (28). Uma vez diferenciadas essas células podem ser transferidas para outras linhagens de camundongos e assim induzir EAE. Depois de um período de diversos dias, dependendo da linhagem de camundongos e método usado, os camundongos exibem sintomas típicos tais como paralisia da cauda, do membro posterior e perda de peso (28).

Neste trabalho, utilizamos o modelo de EAE induzido por MOG. Esta é uma proteína

minoritária da mielina do SNC produzida pelos oligodendrócitos. Apesar de constituir somente 2,5% das proteínas da mielina, a imunização pela MOG é capaz de causar um potente efeito encefalitogênico, permitindo induzir a EAE em uma variedade de espécies, como mencionado acima. (29).

A MOG é composta de 218 aminoácidos que se distribuem em diferentes domínios. Um domínio inicial é extracelular e tem caráter de imunoglobulina (Ig, resíduos 1-125). Este é seguido por um domínio transmembranar, de caráter hidrofóbico (resíduos 126-146). Ainda na sequência encontra-se um domínio citoplasmático (resíduos 147-181), ao qual se segue um segundo domínio hidrofóbico transmembranar (resíduos 182-202) e um segundo domínio extracelular (resíduos 203-218). O território Ig exposto ao espaço extracelular permite consequentemente, o livre acesso a anticorpos (30)

A exata função da MOG ainda permanece desconhecida, mas sua estrutura e localização sugere que funcione como molécula de adesão, mantendo a integridade estrutural da bainha de mielina (31).

A sequência 35-55 do peptídeo sintético MOG foi utilizada no presente trabalho. Essa sequência de aminoácidos constitui o epítipo dominante, que é capaz de induzir respostas mediadas por anticorpos e por células T. A ativação das células T ocorre normalmente com ajuda das células apresentadoras de antígenos (células dendríticas, células B e macrófagos) que apresentam o antígeno via MHC classe 2 e ativam células T CD4+. As células CD8+, por outro lado, interagem somente com MHC classe 1. Além disso a apresentação de antígenos para linfócitos T citotóxicos, pode ser reforçada por citocinas inflamatórias tais como interferon gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) ou por supressão da atividade elétrica (bloqueio dos canais de sódio). Interessantemente, o MHC classe 1 foi encontrado aumentado em todos os tipos de celulares do SNC em lesões de EM, incluindo neurônios. Além disso, os linfócitos T citotóxicos (LTC), podem reconhecer antígenos presente nos oligodendrócitos e neurônios. Uma vez ativado, eles podem ser parcialmente responsável pela desmielinização, lesão axonal e morte neuronal que ocorre na EM. As células CD8+ são encontradas no SNC na EM e expandem clonalmente nas lesões de EM, uma característica que não tem sido demonstrada pelas CD4+ (32).

De maneira semelhante ao que ocorre na EM, inúmeros estudos também descrevem a presença de lesão axonal e perda neuronal na EAE (19,20, 33-36).

2 OBJETIVO

O objetivo no presente projeto é estudar se existem alterações periféricas envolvendo a transmissão neuromuscular e a musculatura esquelética de animais portadores de Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE) induzida pela proteína oligodendrocítica da mielina (MOG). Assim conhecer melhor um modelo experimental de EM, pode propiciar, por extensão, um melhor conhecimento da EM propriamente dita.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Nos experimentos realizados neste trabalho foram utilizados camundongos fêmeas C57BL/6J. A utilização de animais fêmeas se baseia em dados epidemiológicos mostrando que a incidência de EM em humanos é maior em mulheres do que em homens (5). Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan. Eles foram mantidos em caixas de micro-ambiente, em sala apropriada com isolamento acústico e controle de temperatura (22 ± 1 °C) e de ciclo claro-escuro (12h/12h). Os animais receberam água e ração *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela comissão de ética no uso de animais do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB), registrado sob nº 99 nas folhas 03 do livro 09.

3.1 Indução da EAE

Para se obter camundongos portadores da EAE, 63 animais foram imunizados com a Glicoproteína Oligodendrocítica de Mielina (MOG), acompanhada de Adjuvante Completo de Freund (ACF) e toxina pertussis (TP). Em adição aos animais imunizados, animais controles também foram incluídos, os quais foram separados em dois grupos:

- a) Grupo controle: onde os animais não foram submetidos a qualquer procedimento experimental;
- b) Grupo Adjuvante de Freund (ACF) + Toxina Pertussis (TP): onde os animais foram tratados de maneira semelhante aos animais do grupo EAE, porém sem a utilização da proteína MOG.

Dois diferentes protocolos de imunização foram testados no intuito de otimizar a obtenção de animais doentes em razoável quantidade. Estes protocolos são descritos de maneira pormenorizada a seguir.

Protocolo 1

- a) 200 µg de MOG liofilizada (Sigma Aldrich), reconstituída em 100 µl de água deionizada;
- b) 100 µl de ACF (Sigma-Aldrich) contendo 100 µg de *Mycobacterium tuberculosis* (H37Ra, Difco) inativada por calor e dessecada;
- c) 150 ng de toxina pertussis (Sigma-Aldrich), diluída em salina, volume final de 200 µl.

Como tal protocolo revelou-se pouco efetivo, com apenas 12,5% de incidência da doença, adotou-se o protocolo 2, com algumas modificações em relação ao protocolo 1.

Protocolo 2

- a) 200 µg de MOG liofilizada (Proteimax®), reconstituída em 100 µl de tampão fosfato (PBS);
- b) 100 µl de Adjuvante Incompleto de Freund (AIF, Sigma-Aldrich);
- c) 500 µg de *Mycobacterium tuberculosis* (H37RA, Difco) inativada por calor e dessecada, adicionada aos 100 µl de AIF;
- d) 300 ng de toxina pertussis liofilizada (Sigma-Aldrich), reconstituída em água deionizada e estabilizada com 1000 µg de soro albumina bovino (BSA). Solução salina foi adicionada para um volume final de 200 µl.

Nos dois protocolos a emulsão de MOG foi emulsificada em ACF ou AIF em seringa de vidro, até a obtenção de uma solução homogênea. Os animais receberam uma injeção dessa solução na base da cauda por via subcutânea. Quanto à toxina pertussis, a mesma foi injetada por via intraperitoneal, imediatamente e 48 horas após a imunização, em ambos os protocolos.

Aspectos relevantes a se apontar, do 1º para o 2º protocolo foi a dose da toxina pertussis, que foi dobrada de 150 ng para 300 ng, e a dose de *Mycobacterium tuberculosis*, que foi aumentada de 100 µg para 500 µg. A utilização do protocolo 2 mostrou-se extremamente efetiva, sempre induzindo sinais clínicos de EAE em 95 a 100% dos animais imunizados. Por isso esse protocolo foi mantido nas rodadas seguintes de imunização.

3.2 Avaliação da evolução da doença

Os animais dos grupos controle, ACF+TP e EAE foram acompanhados diariamente, quanto ao desenvolvimento da doença, por meio de uma escala de avaliação motora e medida da massa corporal em balança. A escala de avaliação motora consistiu dos seguintes critérios: grau 0: ausência de sinais; grau 1: perda do tônus da cauda; grau 2: paralisia parcial dos membros posteriores; grau 3: paralisia total dos membros posteriores (45).

O acompanhamento dos animais incluiu a filmagem de cada um para uma melhor documentação do comprometimento motor. A avaliação se iniciou a partir do 1º dia pós-imunização (d.p.i.) e no mínimo se estendeu até o 50º d.p.i.

Esta etapa do trabalho foi realizada no Instituto Butantan, Laboratório Especial de Dor e Sinalização, em colaboração com a Dra. Gisele Piccolo.

3.3 Estudos miográficos

De acordo com o objetivo proposto, contrações musculares indiretas e diretas foram estudadas. As contrações musculares indiretas foram geradas por estímulos elétricos aplicados ao nervo isquiático e as contrações diretas foram geradas por estimulação elétrica do próprio músculo. A finalidade das contrações indiretas é avaliar a funcionalidade da transmissão neuromuscular enquanto que as contrações diretas avaliam a dinâmica da contratilidade muscular.

Os próximos tópicos descrevem os procedimentos experimentais para o registro de ambos os tipos de contrações.

3.3.1 Retirada da preparação nervo-músculo e do músculo ELD

Os animais que apresentaram grau 3, que correspondia a paralisia total dos membros inferiores foram separados para os experimentos miográficos. A preparação do nervo isquiático-músculo extensor longo dos dedos foi removida do animal sob anestesia geral induzida por 100 mg/kg de ketamina e 10 mg/kg de xilazina injetadas intraperitonealmente. A pele da face ântero-lateral de uma das patas posteriores e o músculo tibial anterior foram rebatidos, evidenciando o músculo extensor longo dos dedos (ELD). A seguir o tendão distal

do ELD foi seccionado e o músculo foi dissecado até seu terço superior. A partir deste momento foi feita a dissecação do nervo isquiático. Para isso, a pele da região dorsal do membro posterior do animal foi rebatida e os músculos desta região foram divulsionados expondo o nervo isquiático. Este foi seccionado próximo à coluna vertebral e dissecado até sua inserção no músculo ELD. Num estágio final, seccionou-se o tendão proximal do músculo ELD. Desta forma isolou-se a preparação nervo isquiático-músculo extensor longo dos dedos.

Para a retirada do músculo ELD isolado, os mesmos procedimentos foram realizados, porém sem a necessidade de realizar a dissecação do nervo isquiático. Durante o procedimento cirúrgico as preparações foram intermitentemente umedecidas com solução nutriente (Ringer) de composição descrita a seguir. As preparações isoladas foram banhadas *in vitro* com uma solução fisiológica da seguinte composição: NaCl: 135 mM ; KCl: 5 mM; MgCl₂: 1mM; CaCl₂: 2 mM; NaHCO₃: 15 mM; Na₂HPO₄: 1 mM; glicose: 11 mM; pH: 7.3-7.4. Durante o experimento essa solução foi continuamente aerada com uma mistura de O₂ (95%) e CO₂ (5%). Todos os experimentos foram realizados em temperatura ambiente (22-24 °C).

3.3.2 Registro da contração muscular

As preparações foram mantidas verticalmente em uma cuba, em solução fisiológica de composição descrita acima. O tendão distal do músculo extensor longo dos dedos foi amarrado a um suporte e o tendão proximal foi amarrado a um transdutor de força isométrica (F-60; Narco Bio-Systems, Houston, Texas, USA) conectado a um polígrafo (MK-III-P; Narco Bio-Systems, Houston, TX, USA).

A figura 4 ilustra o sistema utilizado para o registro das contrações musculares indiretas e diretas.

Figura 4 - Aparato experimental para os registros de contrações isoladas e tetânicas.

A tensão basal para obter a força muscular máxima desenvolvida foi encontrada por tentativa e erro, em cada experimento. As contrações isoladas indiretas ou diretas foram geradas por pulsos de voltagem supra-máxima, de duração de 0,5 ms e frequência de 0,2 Hz. Nas contrações tetânicas indiretas foram utilizadas frequências de estimulação de 75, 100, 125, 150, 175 e 200 Hz e nas contrações tetânicas diretas frequências de estimulação de 75, 100, 150 e 200 Hz.

Para evocar contrações indiretas, os pulsos foram aplicados ao nervo isquiático por meio de um eletrodo de sucção conectado a um estimulador eletrônico (RFM, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Nas contrações diretas os pulsos foram aplicados através de dois eletrodos de platina, sendo um eletrodo posicionado próximo ao tendão proximal e outro eletrodo ao tendão distal do músculo ELD.

Os experimentos miográficos de contrações indiretas isoladas consistiram do seguinte. Uma vez montada a preparação, esta foi mantida por 1 hora em período de estabilização. As contrações indiretas isoladas foram continuamente geradas na frequência de 0,2 Hz. Após o registro de contrações-controles, indicativas do estado fisiológico do processo de transmissão neuromuscular, foram realizadas curvas concentração-resposta para o bloqueador neuromuscular pancurônio. Este bloqueador foi aplicado de maneira cumulativa, observando-se intervalos de 30 minutos entre as aplicações. As curvas

concentração-resposta forneceram a concentração inibitória 50% (CI₅₀) do pancurônio relativa às contrações isoladas, tanto em animais mostrando sinais clínicos de EAE, como em animais dos grupos controle e ACF+TP.

Contrações indiretas tetânicas foram geradas em frequências de 75, 100, 125, 150, 175 e 200 Hz e tiveram a duração de 1 a 2 segundos. As estimulações tetânicas foram aplicadas a intervalos mínimos de 15 min. Entre os períodos de estimulações tetânicas a preparação era estimulada em baixa frequência (0,2 Hz). Após o registro de contrações tetânicas controles (nas seis diferentes frequências de estimulação acima explicitadas) o bloqueador neuromuscular pancurônio era aplicado, em concentração única, e todas as seis frequências de estimulação eram reaplicadas ao nervo motor, na presença deste bloqueador. De maneira semelhante às contrações isoladas controles, as contrações tetânicas controles também serviram de indicativo do estado fisiológico do processo de transmissão neuromuscular.

Contrações diretas isoladas e tetânicas também foram estudadas, seguindo-se o mesmo delineamento experimental empregado no estudo das contrações indiretas isoladas e tetânicas.

O registro da contração muscular em papel permitiu obter variáveis fisiológicas como a amplitude máxima de contração (tanto no caso de contrações isoladas como no de tetânicas); e avaliar, no caso das contrações tetânicas, a capacidade de manutenção, pelo músculo, dessa contração. Esta capacidade foi avaliada através de uma variável denominada "manutenção do tétano". No caso das contrações tetânicas indiretas esta variável correspondeu à força de contração tetânica mensurada 1 segundo após a instalação da amplitude tetânica máxima.

No caso das contrações tetânicas diretas esta variável correspondeu à força de contração tetânica mensurada 2 segundos após a instalação da amplitude tetânica máxima.

3.4 Bloqueador neuromuscular utilizado

O brometo de pancurônio (Pancuron®, Cristália, São Paulo, Brasil), um bloqueador competitivo ou não despolarizante da transmissão neuromuscular foi utilizado nos experimentos miográficos (42, 43, 44). Curvas concentração resposta para o bloqueador foram realizadas nos estudos de contrações indiretas isoladas. Essas curvas permitiram obter

concentrações inibitórias 50% (CI₅₀) por meio de regressão não linear, utilizando o programa Graph Prisma. Nos estudos das contrações indiretas tetânicas foi utilizada uma concentração única de pancurônio, capaz de induzir um bloqueio parcial do tétano e avaliou-se a capacidade da preparação responder a diferentes frequências. Os experimentos de contração muscular direta foram realizados na presença de uma concentração de pancurônio suficiente para bloquear totalmente a contração muscular indireta.

3.5 Estudo dos tipos e da área de secção transversa das fibras musculares do ELD

Animais dos grupos controle, ACF+TP e EAE (grau 3) foram eutanasiados e o músculo ELD foi isolado. Os tendões proximal e distal do músculo ELD foram cortados e a porção medial foi emblocada em um macerado de fígado do próprio camundongo. Após esse procedimento, o músculo foi mergulhado em isopentano, e em seguida em nitrogênio líquido, realizando-se assim o congelamento. As amostras congeladas foram armazenadas em freezer a -70 °C até serem utilizadas.

Cortes histológicos de 10 µm de espessura, transversais e seriados, foram obtidos da região medial do ELD em criostato (Leica, Nussloch, Alemanha). Os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas e mantidos a temperatura de -25 °C durante o procedimento. A integridade do tecido muscular foi avaliada pela coloração de hematoxilina e eosina, seguida de observação em microscópio óptico. Posteriormente, as lâminas foram guardadas em freezer a -70 °C até a realização dos procedimentos abaixo.

Para os procedimentos histoquímicos as lâminas foram separadas em duas cubas, uma das quais contendo solução de caráter ácido (pH=4.1) e outra de caráter alcalino (pH=10.3).

As lâminas a serem incubadas em solução alcalina foram previamente fixadas com formol cálcio de Baker (2 g de CaCl₂ acrescentadas de 200 ml de formalina 10%) durante 4 minutos a 4° C. Em seguida, essas lâminas foram lavadas no mínimo três vezes com água destilada e incubadas em temperatura ambiente por 10 minutos em tampão glicina (0,75g de glicina; 0,585g de cloreto de sódio; 0,8g de cloreto de cálcio; água destilada q.s.p. 100 ml; e 90 ml de NaOH 0,1M, pH 10.3).

A exposição das lâminas à solução de caráter ácido se deu pela incubação destas em tampão acetato (1,197 g de acetato de sódio em 44 ml; 0,6 ml de ácido acético glacial em 50

ml; água destilada q.s.p. 200 ml e 530 mg de $\text{CaCl}_2\text{H}_2\text{O}$, pH 4.1), durante 10 minutos à temperatura ambiente

Após serem pré-incubadas com tampão glicina (pH ácido) ou tampão acetato (pH alcalino), as lâminas foram lavadas três vezes com água destilada e incubadas em tampão ATP (80 ml de tampão glicina contendo 0,133 g de ATP), por 35 minutos a 37°C. Posteriormente, as lâminas foram enxaguadas em água destilada no mínimo três vezes e mantidas em cloreto de cobalto 2% durante cinco minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram novamente lavadas com água destilada e finalmente incubadas em solução de sulfeto de amônio (250 µl em 80 ml de água destilada), em temperatura ambiente por 3 minutos. Após lavagem, as lâminas foram montadas com gelatina-glicerina e submetidas a análise microscópica.

Imagens digitais das fibras musculares do músculo ELD pré-incubadas em pH ácido (4.1) ou pH alcalino (10.3) foram capturadas em microscópio óptico em aumento de 20 vezes. Após a aquisição das imagens, o número e a área de secção transversa de cada tipo de fibra muscular foram obtidos utilizando o programa Image Pro Plus (46).

3.6 Análise estatística

O presente trabalho envolveu diferentes tipos de variáveis biológicas as quais correspondem a diferentes variáveis estatísticas. A escala de avaliação motora empregada é uma variável do tipo qualitativa, do subtipo ordinal. O subtipo ordinal de variável qualitativa se define quando os objetos e eventos são distribuídos em categorias mutuamente exclusivas, que possuem ordem, mas apresentam significados diferentes (47). Esse é o caso da escala de avaliação numérica da EAE utilizada em nosso estudo, onde os números indicam uma ordem (grau 0, 1, 2, e 3) com significados diferentes. O grau 3 vem depois do grau 1 porque indica maior comprometimento motor, mas o grau 3 não significa o triplo do grau 1 (47).

As variáveis biológicas como a massa corporal e muscular dos animais, a força de contração muscular e a área de secção transversa do músculo ELD são de natureza quantitativa. Estas apresentam valores numéricos e são subdivididas em contínuas ou discretas (47), sendo do tipo contínuo todas as mencionadas nesse parágrafo. Os tipos de fibras musculares I, IIA e IIB no músculo ELD constituem variável quantitativa discreta.

A análise estatística empregada em nosso estudo levou em conta as diferentes naturezas das variáveis biológicas presentes neste trabalho.

Um procedimento realizado foi a análise descritiva dos dados, apresentados na forma de média aritmética $\pm$ erro padrão da média, utilizados como medidas de tendência central e de dispersão dos dados respectivamente. A inferência estatística foi realizada por meio de testes paramétricos (ANOVA, utilizando 1 ou 2 critérios) e pós test escolhidos de acordo com o tipo de variável em questão. O nível de significância estabelecido foi de 5%.

4 RESULTADOS

Embora os protocolos de indução da EAE estejam minuciosamente descritos na seção de Materiais e Métodos, considerou-se importante enfatizar, nesta seção de Resultados, as modificações introduzidas nos protocolos de indução da EAE na tentativa de obter a doença em um número expressivo de animais imunizados. No segundo protocolo em relação ao primeiro, as modificações consistiram de aumentar cinco vezes a dose de *Mycobacterium tuberculosis* e duas vezes a dose de toxina pertussis.

Tabela 1 - Número de animais imunizados, incidência porcentual de animais com EAE e dia de início dos sinais clínicos da EAE nas diferentes rodadas de imunização.

<i>Rodadas de Imunização</i>	<i>Animais imunizados (n)</i>	<i>Incidência de animais com EAE (%)</i>	<i>Dia de início da EAE</i>
<i>1ª (protocolo 1)</i>	<i>8</i>	<i>12,5</i>	<i>22ª *</i>
<i>2ª (protocolo 2)</i>	<i>10</i>	<i>100</i>	<i>11,3 ± 0,6</i>
<i>3ª (protocolo 2)</i>	<i>16</i>	<i>100</i>	<i>12,1 ± 0,4</i>
<i>4ª (protocolo 2)</i>	<i>19</i>	<i>95</i>	<i>11,3 ± 0,3</i>
<i>5ª (protocolo 2)</i>	<i>10</i>	<i>100</i>	<i>11,9 ± 0,4</i>

Valores do dia de início da EAE indicam média ± erro padrão da média.

O asterisco indica apenas 1 animal.

A tabela 1 descreve os resultados desses procedimentos, notar que a modificação do protocolo 1 para o protocolo 2 levou a indução da EAE numa grande maioria ou, mais frequentemente, na totalidade dos animais em cada grupo estudado.

4.1 Avaliação motora dos animais imunizados

Os 55 animais constituintes das imunizações realizadas utilizando o protocolo 2, foram avaliados diariamente quanto a sua evolução clínica utilizando uma escala de avaliação motora (graus de 0-3) explicitada em Material e Métodos. Os dados correspondentes a essa avaliação aparecem na figura 5.

Figura 5 - Média diária ($\pm$ erro padrão da média) dos graus de avaliação motora no total dos animais utilizados

Notar na figura 5 que o início do aparecimento dos sinais clínicos de EAE e a fase de pico desses sinais (que corresponde ao maior grau na escala de avaliação motora após a imunização) ocorreram no 12º e 15º d.p.i, respectivamente. Após esse período houve queda dos valores diários em direção a um platô que foi atingido por volta do 24º d.p.i. e permaneceu até o 50º d.p.i. Os animais dos grupos controle e ACF+TP não apresentaram sinais clínicos de EAE.

4.2 Evolução da massa corporal dos animais utilizados

Os animais dos diferentes grupos experimentais, controle, ACF+TP e EAE, tiveram a sua massa corporal avaliada diariamente. Esses dados aparecem na figura 6.

Figura 6 - Evolução da massa corporal dos animais até cinquenta dias pós-imunização

Notar na figura 6 que a massa corporal dos animais do grupo EAE foi significativamente menor em relação aos grupos controle e ACF+TP. Mais especificamente, o grupo EAE apresentou um decréscimo inicial por volta do 11º d.p.i. que atingiu maior magnitude por volta do 15º d.p.i. Após esse período esse mesmo grupo apresentou recuperação parcial da massa corporal, porém com os valores se mantendo inferiores quando comparados aos grupos controle e ACF+TP. A evolução das massas corporais dos animais do grupo controle e ACF+TP foi semelhante, havendo em ambos os casos um aumento gradativo da massa corporal durante o período avaliado.

4.3 Massa corporal dos animais no dia do experimento

A massa corporal dos animais no dia do experimento miográfico foi mensurada e comparada entre os grupos. Esses dados são apresentados na figura 7.

Figura 7 - Massa corporal mensurada no dia do experimento miográfico de animais do grupo controle, ACF+TP e EAE.

Os grupos controle, ACF+TP e EAE estão representados pela média $\pm$ erro padrão da média. O asterisco indica diferença significativa ($p < 0,05$). *Anova 1 via, pós test de Tukey*. Número de animais: controle ($n=18$), ACF+TP ($n=13$) e EAE ($n=22$).

Notar na figura 7 que os animais EAE apresentaram uma diminuição da massa corporal em comparação aos grupos controle e ACF+TP. Os grupos controle e ACF+TP não apresentaram diferença significativa em relação à massa corporal.

4.4 Massa do músculo ELD

Figura 8 - Massa do músculo ELD

Os grupos controle, ACF+TP e EAE estão representados pela média $\pm$ erro padrão da média. O asterisco indica diferença significativa ($p < 0,05$). *Anova 1 via, pós test de Tukey*. Número de animais: controle ($n=18$), ACF+TP ($n=13$) e EAE ($n=22$).

Após os experimentos miográficos, o peso seco do músculo ELD foi mensurado. Esses dados são apresentados na figura 8.

Notar na figura 8 que os animais EAE apresentaram uma diminuição da massa do músculo ELD em comparação aos grupos controle e ACF+TP. Os animais deste último grupo também diferiram dos animais controle e EAE.

4.5 Estudos miográficos

Nestes experimentos, utilizando o músculo ELD, foram registradas contrações indiretas e diretas, tanto isoladas quanto tetânicas (geradas como explicitado em Material e Métodos), na ausência e na presença do bloqueador neuromuscular pancurônio. Estes experimentos serão descritos a seguir.

4.5.1. Contrações indiretas isoladas

A figura 9 ilustra um experimento de contrações indiretas isoladas realizadas em nossas condições experimentais.

Figura 9 - Contrações indiretas isoladas registradas na ausência e presença de pancurônio em animal grau 3 de EAE

O pancurônio foi administrado de maneira cumulativa, nas concentrações crescentes indicadas na figura. Calibração vertical = 0,5 g/quadrado; calibração horizontal = 20 s/quadrado.

Experimentos como o ilustrado na figura 9, foram replicados utilizando preparações neuromusculares obtidas de animais integrantes dos grupos controle, ACF+TP e EAE. Isso permitiu obter dados na ausência e presença de pancurônio.

4.5.1.1 Dados na ausência de pancurônio

Nestes experimentos, a força de contração muscular indireta isolada foi registrada utilizando animais dos grupos controle, ACF+TP e EAE. Tais dados aparecem na figura 10.

Figura 10 - Força de contração muscular indireta isolada

Os grupos controle, ACF+TP e EAE estão representados pela média $\pm$ erro padrão da média.

O asterisco indica diferença significativa ($p < 0,05$). *Anova 1 via, pós test de Tukey.*

Número de animais: controle ($n=13$), ACF+TP ($n=10$) e EAE ($n=17$).

Notar na figura 10 que em relação ao grupo controle os animais EAE apresentaram diminuição da força da contração isolada evocada indiretamente no músculo ELD.

4.5.1.2 Dados na presença de pancurônio

Nestes experimentos curvas concentração-resposta relativas ao efeito bloqueador do pancurônio sobre contrações indiretas isoladas foram obtidas utilizando animais dos grupos controle, ACF+TP e EAE. Isso é ilustrado na figura 11, na forma de curvas concentração-resposta individualizadas para cada grupo estudado.

Figura 11 - Curvas concentração-resposta do efeito bloqueador do pancurônio sobre a contração muscular indireta isolada

Os valores de Cl_{50} nos experimentos individualizados acima foram: controle ($1,50 \times 10^{-7} M$); ACF+TP ($1,50 \times 10^{-7} M$) e EAE ($1,90 \times 10^{-7} M$).

Experimentos como os ilustrados na figura 11 foram replicados fornecendo dados de Cl_{50} do pancurônio que constituem a figura 12.

Figura 12 - Gráfico de barras representativo das CI_{50} de pancurônio relativas ao bloqueio da contração indireta isolada

Os grupos controle, ACF+TP e EAE estão representados pela média $\pm$ erro padrão da média. Número de animais: controle (n=4), ACF+TP (n=3) e EAE (n=5). *Anova 1 via, pós test de Tukey.*

Notar na figura 12 que o bloqueador neuromuscular pancurônio atuou com potência semelhante nos três grupos de animais, o que é indicado por valores de CI_{50} que não diferiram significativamente.

4.5.2 Contrações indiretas tetânicas

As contrações indiretas tetânicas foram registradas em diferentes frequências na ausência e presença de pancurônio, em animais dos grupos controle, ACF+TP e EAE. Essas contrações foram analisadas segundo duas propriedades: amplitude máxima e capacidade de manutenção da contração tetânica. Esta capacidade foi avaliada mensurando-se a força da contração tetânica num momento correspondente a 1 segundo após o músculo ter atingido a amplitude máxima. Esses experimentos também foram realizados na ausência e presença de pancurônio.

Figura 13 - Contrações indiretas tetânicas em diferentes frequências de estimulação na ausência de pancurônio

Calibração vertical: grupo Controle (2,5 g/quadrado), ACF+TP (1g/quadrado) e EAE (2,5 g/quadrado).
Calibração horizontal para todos os grupos: 0,1 segundo/quadrado.
Experimentos individualizados em cada grupo.

Com relação à figura 13 deve-se apontar inicialmente que os registros nela ilustrados constituem três experimentos independentes, realizados em diferentes dias de experimentação. Com isso a amplificação empregada no registro das contrações não foi a mesma nas três condições, como apontado na legenda da figura. Assim, o exame das contrações tetânicas ilustradas na figura 13 sugere inicialmente uma força maior de contração tetânica para o animal ACF+TP, em relação aos outros dois grupos. Isso na realidade não ocorreu, pois o registro da força de contração tetânica nesse animal foi obtido com uma amplificação maior que aquela empregada nas situações controle e EAE.

Em suma, em termos da amplitude máxima da contração indireta tetânica não houve diferença significativa entre os 3 grupos estudados e isso é ilustrado de maneira global na figura 14. Porém, é plenamente justificado avaliar a capacidade de manutenção da

contração tetânica a partir do exame do perfil da mesma nas 3 condições experimentais estudadas. Em sendo assim, os registros ilustrados na figura 13 são claramente sugestivos de que os músculos dos animais EAE são mais resistentes à estimulação tetanizante, ao mostrarem uma maior capacidade de manutenção do tétano do que os animais controle e ACF+ TP. Isso é ilustrado de maneira global na figura 15.

Figura 14 - Amplitude máxima indireta tetânica em diferentes frequências de estimulação

Os grupos controle, ACF+TP e EAE estão representados pela média $\pm$ erro padrão da média.

Número de animais: controle (n= 8), ACF+TP (n=6) e EAE (n=8).

Anova 2 vias, pós test de Tukey.

Notar na figura 14 que não houve uma diferença significativa entre os grupos com relação a amplitude máxima da contração tetânica, embora tenha se notado uma tendência a valores menores nos grupos ACF+TP e EAE.

Figura 15 - Manutenção do tétano 1 segundo após a instalação da amplitude máxima em diferentes frequências de estimulação

Os grupos controle, ACF+TP e EAE estão representados pela média $\pm$ erro padrão da média.

O asterisco indica diferença significativa ($p < 0,05$). *Anova 2 vias, pós test de Tukey.*

Número de animais: controle ($n=8$), ACF+TP ($n=6$) e EAE ($n=8$).

Notar na figura 15 que com o aumento da frequência de estimulação houve um decréscimo da manutenção da contração indireta tetânica, que foi muito mais intenso nos grupos controle e ACF+TP em relação ao grupo EAE, indicando uma maior capacidade de manutenção da contração indireta tetânica neste último grupo.

As variáveis avaliadas do ponto de vista fisiológico foram também estudadas do ponto de vista farmacológico, ou seja, na presença do pancurônio. Os dados correspondentes a esses experimentos serão abordados a seguir.

Figura 16- Contrações indiretas tetânicas, em diferentes frequências de estimulação, na presença de pancurônio (0,05 μ M).

Experimentos realizados nos grupos controle, ACF+TP e EAE. Calibração vertical: grupo Controle (2,5 g/quadrado), ACF+TP (1g/quadrado) e EAE (2,5 g/quadrado). Calibração horizontal para todos os grupos: 0,1 segundo/quadrado.

É importante enfatizar, com relação à figura 16, que as preparações neuromusculares estudadas na presença do pancurônio são as mesmas estudadas na sua ausência e que são ilustradas na figura 13. Sendo assim, o comentário com relação à maior amplificação utilizada no registro das contrações tetânicas no grupo ACF+TP, relacionado à figura 13, se aplica também aos dados ilustrados na figura 16. Ou seja, levando-se em conta esse fator diferença de amplificação não se notou clara diferença na amplitude máxima da contração

tetânica entre os grupos, como o ilustrado na figura 16, de maneira individualizada, e na figura 17 para os dados na sua totalidade.

Figura 17- Amplitude máxima indireta tetânica em diferentes frequências de estimulação, na presença de pancurônio (0,05 μ M)

Os grupos controle, ACF+TP e EAE estão representados pela média $\pm$ erro padrão da média.

Número de animais: controle (n=8), ACF+TP (n=6) e EAE (n=6).

Anova 2 vias, pós test de Tukey.

No tocante a capacidade de manutenção da contração indireta tetânica a figura 16 ilustra que o grupo EAE apresentou uma maior capacidade de manutenção na presença de pancurônio. Dados na sua totalidade com relação a essa variável são apresentados na figura 18.

Figura 18- Manutenção da contração tetânica indireta 1 segundo após a instalação da amplitude máxima em diferentes frequências de estimulação na presença de pancurônio ($0,05 \mu\text{M}$)

Os grupos controle, ACF+TP e EAE estão representados pela média $\pm$ erro padrão da média.

O asterisco indica diferença significativa ($p < 0,05$). *Anova 2 vias, pós test de Tukey.*

Número de animais: controle ($n=8$), ACF+TP ($n=6$) e EAE ($n=8$).

Notar na figura 18 que houve diferença significativa na capacidade de manutenção do tétano no grupo EAE em comparação aos grupos controle e ACF+TP. Essa diferença consistiu numa maior resistência estimulação tetanizante no grupo EAE em todas as frequências estudadas.

4.5.3 Contrações diretas isoladas

A figura 19 ilustra os resultados da força de contração direta isolada registrada em animais controle, ACF+TP e EAE.

Figura 19- Força da contração muscular direta isolada

Os grupos controle, ACF+TP e EAE estão representados pela média $\pm$ erro padrão da média

O asterisco indica diferença significativa ($p < 0,05$). *Anova 1 via, pós test de Tukey.*

Número de animais: controle (n=5), ACF+TP (n=3) e EAE (n=5).

Notar que os animais EAE apresentaram diminuição da força da contração isolada evocada diretamente no músculo ELD em relação ao grupo controle e ACF+TP.

4.5.4 Contrações diretas tetânicas

As contrações diretas tetânicas foram avaliadas de acordo com duas propriedades: amplitude máxima e a capacidade de manutenção do tétano. Essa capacidade foi mensurada medindo-se a amplitude da contração em um momento correspondente a 2 segundos após a preparação ter atingido a amplitude máxima (Figura 20).

Nesses experimentos de contração direta, utilizou-se uma concentração saturante de pancurônio suficiente para bloquear qualquer contração indireta que pudesse ocorrer. A força de contração muscular tetânica direta foi registrada nos grupos controle, ACF+TP e EAE.

Figura 20- Contrações diretas tetânicas em diferentes frequências de estimulação.

Calibração vertical: grupo Controle (1 g/quadrado), ACF+TP (1g/quadrado) e EAE (1g/quadrado).
Calibração horizontal para todos os grupos: 0,1 segundo/quadrado.

Figura 21- Amplitude máxima direta tetânica em diferentes frequências de estimulação

Os grupos controle, ACF+TP e EAE estão representados pela média $\pm$ erro padrão da média.
O asterisco indica diferença significativa ($p < 0,05$). Anova 2 vias, pós test de Tukey.
Número de animais: controle (n=5), ACF+TP (n=3) e EAE (n=5).

Notar na figura 21 que houve diferença significativa na amplitude máxima tetânica direta comparando o grupo EAE com os grupos controle e ACF+TP. Essa menor amplitude no grupo EAE se apresentou em todas as frequências estudadas.

Figura 22- Manutenção da contração direta tetânica mensurada 2 segundos após a instalação da amplitude máxima em diferentes frequências de estimulação

Os grupos controle, ACF+TP e EAE estão representados pela média $\pm$ erro padrão da média.

O asterisco indica diferença significativa ($p < 0,05$). Anova 2 vias, pós test de Tukey.

Número de animais: controle (n=5), ACF+TP (n=3) e EAE (n=5).

A figura 22 ilustra a capacidade de manutenção da contração direta tetânica. Notar que comparando o grupo EAE com o grupo controle houve diferença significativa na manutenção da contração direta tetânica, quando as preparações foram submetidas às duas maiores frequências de estimulação.

4.6 Estudos morfológicos

Nesses experimentos, imagens digitais do músculo ELD dos grupos controle, ACF+TP e EAE foram capturadas. A figura 23 ilustra os diferentes tipos de fibras musculares estudadas no presente trabalho: tipos I, IIA e IIB.

Figura 23 - Imagens representativas das fibras musculares que compõem o músculo ELD, estudadas pela técnica de atividade da enzima ATPase miofibrilar (pH 10,3).

A: grupo controle; B: grupo ACF+TP e C: grupo EAE. A barra representa 50 μm .

Em pH 10,3 nota-se, na situação controle, o predomínio de fibras do tipo IIB sobre as do tipo IIA. Esse diferencial de densidades entre os tipos IIA e IIB se mostra diminuído na situação ACF+TP e desaparece no grupo EAE. Os critérios diferenciais entre os subtipos de fibras musculares IIB e IIA são de que a primeira apresenta uma maior área de secção transversa e tonalidade mais clara em relação a IIA.

Utilizando imagens como as ilustradas na figura 23, a área de secção transversa das fibras musculares do ELD assim como a distribuição dessas fibras quantos aos seus tipos (I, IIA e IIB) nos grupos controle, ACF+TP e EAE foram avaliadas.

Tabela 2- Tipos e áreas de secção transversa das fibras musculares do ELD.

Tipo de fibra	Área de secção transversa (μm^2)		
	Controle	ACF+TP	EAE
I	682 ^a ±37 ^b (7) ^c	484±19 (12)	437±27 (3)
IIA	902±19 (171)	718±13 (379) *	749±14 (276) *
IIB	2.112±24 (357)	1.424±19 (556) *	1.412±20 (275) *

Os grupos controle, ACF+TP e EAE estão representados pela média ± erro padrão da média.

a= média aritmética; b=erro padrão da média e c= número de fibras avaliadas de músculos obtidos no mínimo de três animais nos grupos controle, ACF+TP e EAE.

O asterisco indica valor de $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. Anova 2 vias, pós test de Tukey.

Notar na tabela 2, que os animais dos grupos ACF+TP e EAE apresentaram uma menor área de secção transversa nas fibras do tipo IIA e IIB em relação ao grupo controle.

A distribuição dos tipos de fibras musculares do ELD nas três diferentes condições de estudo do presente trabalho também foram estudadas e aparecem na figura 23.

Figura 24 – Distribuição porcentual dos tipos de fibras musculares

Número de animais: controle (n=3), ACF+TP (n=4) e EAE (n=3).

O asterisco indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. *Anova 2 vias, pós test de Tukey.*

Notar que a distribuição de tipos de fibras musculares modificou-se no grupo EAE, que passou a apresentar a mesma proporção de fibras IIA e IIB, diferenciando-se assim do grupo controle.

5 DISCUSSÃO

Esta discussão será realizada em tópicos, que serão abordados na sequência de apresentação dos resultados.

5.1 Otimização do processo de indução da EAE no presente trabalho.

Com o intuito de obter animais EAE, foram realizadas cinco rodadas de imunizações, já minuciosamente descritas em Materiais e Métodos. A concentração de MOG foi a mesma em todas as rodadas; já a concentração de *Mycobacterium tuberculosis* adicionada ao Adjuvante Incompleto de Freund (AIF), foi aumentada de cinco vezes a partir da segunda rodada de imunização. Ao mesmo tempo, o outro adjuvante utilizado, a toxina pertussis, também teve sua dose aumentada, nesse caso de duas vezes.

Dado que foi fundamental, neste trabalho, manipular a concentração dos adjuvantes para aumentar a incidência de animais EAE, considerou-se importante revisar alguns aspectos relacionados a estes compostos.

Assim, os adjuvantes são definidos como substâncias que injetadas em associação com o antígeno amplificam a resposta imune, celular e/ou humoral, ao mesmo (48, 49, 50).

Tomando-se como exemplo o Adjuvante Incompleto de Freund (AIF) sugere-se como possíveis os seguintes mecanismos de ação:

- a) formação de depósito (efeito “depot”) no sítio da injeção, o que lentifica a liberação do antígeno prolongando assim a sua presença no organismo;
- b) secreção transitória local de citocinas e quimiocinas, que recrutam células imunologicamente competentes ao sítio de injeção;
- c) células apresentadoras de antígeno (APCs) recrutadas expressam vários receptores que são reconhecidos e/ou ativados pelos adjuvantes, levando à ativação e maturação das células APCs recrutadas;
- d) as células APCs maduras aumentam a expressão de MHC e de moléculas co-estimulantes, e se tornam mais capazes em processar e apresentar o antígeno;

e) as células APCs maduras migram para os linfonodos que drenam a região e vão ativar células B secretoras de anticorpos e células T CD8⁺ participantes da fase efetora da resposta imune (49).

Os efeitos do AIF acima citados podem ser potencializados pela adição da *Mycobacterium tuberculosis* ao AIF, o que leva à obtenção do Adjuvante Completo de Freund (ACF). Quanto ao papel da *Mycobacterium tuberculosis* presente no ACF esta é reconhecida por receptores presentes em células imunocompetentes o que estimula as mesmas a liberarem mediadores e expressarem receptores de membrana que irão levar a uma resposta imune direcionada a linfócitos Th1. A *Mycobacterium tuberculosis* é capaz de induzir uma reação do tipo hipersensibilidade tardia, que corresponde a uma intensa resposta inflamatória que dura em torno de 2 a 3 dias e apresenta localmente uma maior concentração de macrófagos e um número menor de linfócitos T ao redor da lesão (51). Assim, a concentração cinco vezes maior de ACF utilizada em nossas imunizações reforçou a resposta autoimune provavelmente por gerar uma reação de hipersensibilidade tardia e ativação de células T CD4⁺ e CD8⁺ (51).

Outro adjuvante utilizado em nosso estudo foi a toxina pertussis (TP). Quanto ao seu mecanismo de ação, o clássico efeito de aumentar a permeabilidade da barreira hematoencefálica deve ser inicialmente considerado, tendo-se demonstrado que a TP aumenta a expressão de moléculas de adesão que iniciam a infiltração leucocitária no encéfalo (52, 53). Entretanto outros mecanismos também parecem participar desse efeito adjuvante. Por exemplo, a TP induz a maturação de células dendríticas que resulta na expansão de células T efectoras e secreção de INF- γ (52, 53).

5.2 Evolução clínica dos animais EAE no presente trabalho.

No tocante aos resultados referentes à indução da EAE, em nossas condições experimentais (Figura 5), os primeiros sinais clínicos da doença apareceram por volta do 10º d.p.i. e o pico da incidência ocorreu por volta do 15º d.p.i., este valor de pico correspondendo ao momento no qual o número de animais apresentando o grau de doença mais elevado atinge um valor máximo. Esse perfil da evolução clínica dos animais EAE encontrado neste trabalho corresponde a um perfil de remissão parcial monofásica. Deve-se porém apontar que a fase de remissão ilustrada na figura 5 tem dois componentes:

- a) a remissão da doença propriamente dita;
- b) o fato de que animais atingindo o grau 3, o mais avançado da doença, eram sacrificados para a retirada da musculatura utilizada no estudo miográfico, *in vitro*.

Isso tendeu a diminuir a média geral dos graus de doença já que se está retirando do cômputo geral os elementos com maior magnitude. É interessante que se compare estes dados com os de outros laboratórios, encontrados na literatura.

Assim, em trabalho abrangente, a EAE foi induzida em diferentes linhagens de camundongos e empregando diferentes antígenos (45). Em animais de linhagens NOD e C57BL/6J injetou-se subcutâneamente (s.c.) 200 µl de uma emulsão contendo MOG₃₅₋₅₅ (150 µg) adicionada de 400 µg de *Mycobacterium tuberculosis*, em AIF. Em adição, os animais receberam 150 ng de toxina pertussis intravenosamente (iv) no dia da imunização e 48 horas depois. Em ambas as linhagens os primeiros sinais da doença apareceram por volta do 11º d.p.i. e a fase de pico se instalou por volta do 16º d.p.i. Na linhagem NOD, após a fase de pico, os animais apresentaram uma fase de remissão parcial seguida por aumento contínuo dos graus da doença, caracterizando uma evolução crônica progressiva. Por outro lado, na linhagem C57BL/6J os graus de doença se mantiveram muito pouco alterados, após a fase de pico, em um comportamento classificado como recorrente monofásico.

No mencionado trabalho acima, uma das linhagens de camundongos utilizadas, a NOD, diferiu da empregada neste trabalho enquanto que a outra, C57BL/6J, foi a mesma (45). Em adição, e ainda comparando, as doses de MOG, *Mycobacterium tuberculosis* e toxina pertussis utilizadas no mencionado trabalho foram menores do que as utilizadas neste trabalho. Quanto ao início e ao pico do aparecimento de sinais clínicos da EAE os resultados do presente trabalho são muito semelhantes ao citado acima para ambas as linhagens utilizadas pelos autores (45). Entretanto, quanto à evolução temporal pós-pico, a evolução clínica de ambas as linhagens estudadas em (45) foi diferente da observada no presente trabalho, já que eles observaram, na fase pós-pico, um perfil crônico-progressivo, na linhagem NOD, e um recorrente monofásico, na linhagem C57B/6J, enquanto que no caso deste trabalho a evolução clínica pós-pico correspondeu a um perfil do tipo parcialmente remitente e monofásico.

Outra linhagem de camundongos estudada (45) foi a SJL, com os animais sendo tratados com 50 µg de peptídeo proteolipídico (PLP₁₃₁₋₁₅₁) em ACF (4mg/ml) por via s.c. e

150 ng de toxina pertussis, i.v. Neste caso, os primeiros sinais da doença ocorreram por volta do 9º dia pós-imunização e o pico da doença ocorreu por volta do 14º d.p.i. A forma clínica apresentada nesse modelo foi a remitente-recorrente.

Em comparação com os resultados do presente trabalho o início do aparecimento dos sinais clínicos e a fase de pico desses sinais, nos animais SJL (45) ocorreram mais precocemente do que no nosso modelo e a evolução clínica pós-pico da EAE nesses camundongos SJL constituída de uma remissão parcial com duas recaídas subsequentes (45) também diferiu da observada neste trabalho, que foi a remitente monofásica.

Outro estudo passível de comparação com o desenvolvido neste trabalho (54), que utilizaram camundongos fêmeas da mesma linhagem C57BL/6 utilizada neste estudo. Os autores demonstraram que variando as doses dos compostos utilizados para induzir a EAE é possível desenvolver diferentes formas clínicas da doença. Uma delas é a forma crônica, apresentada quando os animais foram imunizados com doses maiores dos compostos. Nesse tipo clínico os animais não apresentam remissão após a fase de pico mantendo-se nesse estágio por um tempo prolongado. A outra forma clínica apresentada ocorreu quando os animais foram imunizados com doses menores. Esta forma foi descrita pelos autores como remitente-recorrente e subdividida pelos mesmos em monofásica e multifásica (54).

Na forma remitente-recorrente monofásica, a remissão não é seguida por um ataque subsequente e os camundongos permanecem em um grau clínico 2 ou menor. Já na forma remitente-recorrente multifásica a remissão é seguida por pelo menos um segundo ataque alcançando um grau 3 de doença ou maior. Um fato importante no grupo remitente é que 99% fizeram remissão para o grau 2 ou menor, contra somente 3,8% de camundongos do grupo crônico (54).

Finalizando este item, os comentários acima ilustram que são muitas as maneiras de se induzir a EAE, com resultados nem sempre coincidentes em se comparando diferentes laboratórios, mesmo quando os procedimentos são aparentemente semelhantes. Fica então a mensagem de que cada laboratório deve procurar o seu “ótimo”, por tentativa e erro, quanto à indução da EAE, como foi o caso do presente trabalho, que atingiu esse “ótimo” a partir da 2ª rodada de imunização.

5.3 Massa corporal e massa do músculo ELD nos animais EAE

Outra variável estudada no presente trabalho foi a massa corporal dos animais. Esta foi abordada de duas diferentes perspectivas:

- a) acompanhamento da evolução temporal da massa corporal do conjunto de animais pela mensuração diária dessa variável (Figura 6);
- b) avaliação da massa corporal dos animais, mensurada no dia do experimento (Figura 7).

Em ambas as abordagens a massa corporal se mostrou diminuída nos animais EAE em comparação a animais dos grupos controle e ACF+TP, sendo que nestes dois últimos grupos a massa corporal apresentou valores semelhantes (Figuras 6 e 7).

As modificações de massa corporal foram acompanhadas de uma diminuição da massa do próprio músculo ELD, nos animais EAE (Figura 8). Deve-se apontar que, com relação à massa do músculo ELD o grupo ACF+TP apresentou valores intermediários entre os dois outros grupos, ou seja, o grupo ACF+TP diferiu tanto do grupo controle como do grupo EAE. (Figura 8), indicando que no caso da variável massa do músculo ELD parte do efeito observado nos animais EAE deve ser atribuída aos próprios adjuvantes. Este achado parece justificar o dito por Billau, anteriormente referido, de que adjuvantes são agentes ativos e não passivos. Por outro lado, deve-se enfatizar que no grupo ACF+TP a massa corporal não diferiu da dos animais do grupo controle e que nenhum animal ACF+TP mostrou qualquer sinal clínico de EAE. E ainda mais, que a massa do músculo ELD nos animais EAE foi significativamente menor que nos animais ACF+TP.

O achado de uma menor massa corporal nos animais EAE acompanhado de uma menor massa do músculo ELD nesses mesmos animais é indicativo de que houve um processo de atrofia na sua musculatura. Teoricamente uma possibilidade é que esta atrofia poderia ser o resultado do déficit motor decorrente da doença, levando a um desuso da musculatura esquelética com a consequente atrofia muscular. Outra possibilidade a ser aventada é que, como comentado na Introdução existe, tanto na EM com na EAE, em adição ao clássico componente de neuroinflamação, um componente de neurodegeneração, com lesão axonal e, mais importante, morte do neurônio motor periférico (20). Com isso existe a possibilidade de que fibras musculares que perderam sua inervação em virtude da morte do neurônio motor sejam objeto de um processo de atrofia por desnervação.

5.4 Contrações isoladas indiretas e diretas

Em relação aos dados de natureza fisiológica, as contrações isoladas indiretas serão discutidas em conjunto com as isoladas diretas, pelo auxílio que esta última traz na discussão das modificações ocorridas quanto às contrações isoladas indiretas.

Assim, tanto as contrações indiretas como as diretas, se mostraram significativamente menores nos animais portadores de EAE, em comparação com animais controles e ACF+TP (Figuras 10 e 19).

Com relação a esses achados deve-se apontar que numa situação de diminuição da contração indireta, se esta alteração se deve exclusivamente a uma alteração do processo de transmissão neuromuscular a contração muscular direta estará plenamente vigente. Isto não aconteceu no presente trabalho, tendo-se encontrado uma diminuição tanto da contração direta como da indireta, diminuições de magnitude comparável. Isto sugere que a diminuição da contração indireta, nos animais EAE, provavelmente não resultou de alteração em alguma etapa do processo de transmissão neuromuscular, mas se deveu a alterações do próprio músculo ELD. Em se lembrando que em animais do grupo EAE, o músculo ELD apresentou menor massa, isto é, mostrou-se atrofiado em relação ao músculo controle, é razoável admitir que isso diminuiu a capacidade contrátil desse músculo, o que afetou tanto a contração isolada indireta como a direta.

5.5 Efeitos do pancurônio sobre as contrações isoladas indiretas.

No tocante aos efeitos do pancurônio sobre as contrações isoladas indiretas, as CI_{50} relativas a este bloqueador não diferiram significativamente comparando os grupos controle, ACF+TP e EAE (Figuras 11 e 12), embora tenha-se notado uma tendência a valores maiores de CI_{50} em animais do grupo EAE (Figuras 11 e 12). Isto é sugestivo de que animais EAE teriam uma menor sensibilidade ao bloqueador pancurônio que os animais dos grupos controle e ACF+TP. Porém considera-se que uma discussão mais aprofundada desta possibilidade deve ser postergada até a discussão dos efeitos do pancurônio sobre as contrações indiretas tetânicas, já que contrações tetânicas constituem um teste mais sensível do estado de bloqueio da transmissão neuromuscular do que a contração isolada (44).

5.6 Contrações tetânicas indiretas e diretas

Retomando dados de natureza fisiológica, as contrações tetânicas serão agora objeto de consideração. Estas contrações serão abordadas levando em conta os dois aspectos que se avaliam quando se trata deste tipo de contração: a máxima capacidade geradora de força de contração, mensurada neste trabalho pela variável amplitude tetânica máxima, e a capacidade de sustentar a contração tetânica no tempo, mensurada neste trabalho pela variável manutenção do tétano.

A figura 13 ilustra registros de contrações tetânicas indiretas, obtidos nas 3 condições experimentais que o presente trabalho abrange: animais controle, ACF+TP e EAE.

Com relação à figura 13 deve-se apontar inicialmente que os registros nela ilustrados constituem três experimentos independentes, realizados em diferentes dias de experimentação. Com isso a amplificação empregada no registro das contrações não foi a mesma nas três condições, como apontado na legenda da figura. Assim, o exame das contrações tetânicas ilustradas na figura 13 sugere inicialmente uma força maior de contração tetânica para o animal ACF+TP, em relação aos outros dois grupos. Isso na realidade não ocorreu, pois o registro da força de contração tetânica nesse animal foi obtido com uma amplificação maior que aquela empregada nas situações controle e EAE.

Em suma, em termos da amplitude máxima da contração indireta tetânica não houve diferença significativa entre os 3 grupos estudados e isso é ilustrado de maneira global na figura 14. Porém, analisando os perfis das contrações tetânicas indiretas (Figura 13), nota-se que no caso dos animais EAE a contração mostrou-se melhor mantida que nos outros dois grupos estudados, de uma maneira frequência dependente, a partir da estimulação das preparações com 125 Hz de frequência (Figura 15). Em sendo assim, os registros ilustrados na figura 13 são claramente sugestivos de que os músculos dos animais EAE são mais resistentes à estimulação tetanizante, ao mostrarem uma maior capacidade de manutenção do tétano do que os animais controle e ACF+TP. Isso é ilustrado para a totalidade dos resultados na figura 15.

Com relação a esse achado deve-se apontar que, fisiologicamente, músculos de contração rápida, caso do ELD utilizado neste trabalho, são menos capazes de manter a contração tetânica do que músculos de contração lenta (40). Deve-se apontar, ainda, que músculos rápidos adquirem características de músculo lento quando submetidos ao desuso

(40). Assim, a possibilidade existe de que, neste trabalho, em virtude do desuso a que foram submetidos os animais EAE, seus músculos alteraram características, de músculo rápido para músculo lento, tornando-se assim capazes de uma melhor manutenção da contração tetânica que os animais controle e ACF+TP.

Esses dados de contração tetânica indireta devem ser cotejados, no momento, com os de contração tetânica direta. Estas contrações serão abordadas levando em conta os dois aspectos que se avaliam quando se trata uma contração tetânica: a máxima capacidade geradora de força de contração, mensurada neste trabalho pela variável amplitude tetânica máxima, e a capacidade de sustentar a contração tetânica no tempo, mensurada neste trabalho pela variável manutenção do tétano.

Assim, com relação à contração tetânica direta a amplitude tetânica máxima foi menor no grupo EAE que nos grupos controle e ACF+TP (Figuras 20 e 21). Isto é condizente com o achado, já discutido, de uma menor amplitude da contração isolada direta, observada no grupo EAE, mas não nos grupos controle e ACF+TP (Figura 19). Em adição, e de maneira semelhante ao observado com a contração tetânica indireta (Figura 13), a musculatura dos animais EAE mostrou-se mais resistente a estimulação tetanizante direta, no sentido de apresentar maior capacidade de manutenção do tétano (Figura 20), em relação aos grupos controle e ACF+TP. Deve-se reconhecer que no caso das contrações tetânicas diretas este fenômeno foi mais discreto no caso das contrações indiretas. Tornou-se inclusive necessário, no sentido de sensibilizar o teste mensurar a variável manutenção do tétano num ponto correspondente a 2 segundos após a instalação da amplitude tetânica máxima. De qualquer maneira, uma melhor manutenção do tétano se observou quando a musculatura dos animais EAE foi testada diretamente com frequências tetanizantes de 150 e 200 Hz (Figuras 20 e 22). A mesma sugestão oferecida no caso da melhor manutenção das contrações indiretas tetânicas no grupo EAE é aplicável neste caso das contrações tetânicas diretas. Isso provavelmente se deveu a mudanças de características da musculatura, de contração rápida para de contração lenta, pelo desuso (40) e pela desnervação que provavelmente acometeu a musculatura dos animais EAE (20).

5.7 Efeitos do pancurônio sobre as contrações tetânicas indiretas.

A figura 16 ilustra efeitos do pancurônio sobre as contrações tetânicas indiretas, nos 3 grupos de animais estudados. É importante enfatizar, com relação à figura 16, que as preparações neuromusculares estudadas na presença do pancurônio são as mesmas estudadas na sua ausência e que são ilustradas na figura 13. Sendo assim, o comentário com relação à maior amplificação utilizada no registro das contrações tetânicas no grupo ACF+TP, relacionado à figura 13, se aplica também aos dados ilustrados na figura 16. Ou seja, levando-se em conta esse fator diferença de amplificação não se notou clara diferença na amplitude máxima tetânica entre os grupos tanto na figura 16 para dados individualizados quanto na figura 17 para os dados na sua totalidade.

No entanto, os efeitos do pancurônio foram extremamente claros quanto ao perfil da contração tetânica, que foi drasticamente modificado nos casos dos grupos controle e ACF+TP e muito menos modificado no caso do grupo EAE (Figuras 16 e 18).

Assim, notou-se claramente uma maior resistência dos músculos dos animais EAE aos efeitos desse bloqueador, comparado aos músculos dos grupos controle e ACF+TP, em todas as frequências de estimulação tetanizante empregadas. (Figuras 16 e 18)

Numa tentativa de explicar a menor sensibilidade das contrações tetânicas indiretas ao pancurônio, em músculos do grupo EAE, deve-se levar em conta, inicialmente, que o processo de transmissão neuromuscular envolve duas etapas: a) a liberação do neurotransmissor acetilcolina pela terminação nervosa pré-sináptica; b) a atuação da acetilcolina liberada sobre os receptores nicotínicos pós-sinápticos (42). Assim, sendo o pancurônio um bloqueador competitivo da junção neuromuscular, modificações do processo de transmissão neuromuscular que poderiam, teoricamente, levar a uma menor sensibilidade ao pancurônio seriam um aumento da liberação de acetilcolina ou um aumento da disponibilidade de receptores nicotínicos. Esta segunda possibilidade parece plausível, nas condições experimentais deste trabalho, porque o músculo do animal EAE passa por fenômenos como paresias ou paralisias, que levam ao desuso da musculatura, o que leva a proliferação de receptores nicotínicos. Em adição, a musculatura do animal EAE pode também ter sofrido o fenômeno da desnervação, e isso classicamente leva à hipersensibilidade por desnervação do músculo esquelético, fenômeno que, igualmente ao desuso, também implica na proliferação de receptores nicotínicos. A desnervação da

musculatura do animal EAE pode ocorrer porque faz parte da patogênese da EAE, como também da EM, um processo de lesão do neurônio motor periférico que pode levar a desnervação da musculatura nesses animais (20).

5.8 Morfologia celular do músculo ELD

No tocante a características morfológicas celulares do músculo ELD, em animais dos 3 grupos estudados no presente trabalho, a tabela 2 ilustra a distribuição das fibras quanto aos tipos: I (fibra lenta), IIA (fibra intermediária moderadamente rápida) e IIB (fibra rápida), com as correspondentes áreas de secção transversa. Quanto aos animais controle os valores da área de secção transversa das fibras, encontrados neste trabalho, são compatíveis com os da literatura para a mesma linhagem de camundongos (46). No tocante aos grupos ACF+TP e EAE, em ambos as áreas de secção transversa das fibras foram significativamente menores que no controle mas não diferiram entre si, indicando a presença de atrofia muscular nesses grupos. Assim esta foi uma outra circunstância, neste trabalho, em que o grupo ACF+TP e o grupo EAE apresentaram valores que não diferiram significativamente. A mesma explicação oferecida na outra oportunidade é aplicável no momento: como já comentado, adjuvantes são substâncias ativas, não só imunologicamente, como também farmacologicamente, diferindo portanto, de um controle absolutamente isento de qualquer tratamento (48, 49, 59).

No grupo controle há predomínio do tipo IIB, que é realmente o tipo de fibra de contração mais prevalente em músculos rápidos, como é o caso do ELD. No grupo ACF+TP o número de fibras IIB diminuiu e o de fibras IIA aumentou. Esta troca de IIB para IIA ficou ainda mais acentuada no grupo EAE, no qual as fibras IIB e IIA passaram a constituir cada uma delas cerca de 50% do total da fibras do músculo. Isso caracteriza uma troca (“shift”) de tipos celulares de IIB a IIA. Essa troca torna o músculo dos animais EAE mais lento que o músculo controle. Esta é uma possível explicação para o fato do músculo do animal EAE ser mais resistente ao tétano do que o do animal controle, já que sabidamente, músculos rápidos são menos capazes de manter a contração tetânica que músculos lentos (40).

6 CONCLUSÕES

Nos animais EAE a transmissão neuromuscular mostrou-se alterada exibindo uma menor sensibilidade ao bloqueador pancurônio, em comparação a animais controles.

Nos animais EAE o músculo ELD mostrou-se alterado, exibindo atrofia em comparação a animais controles. Houve ainda troca (“shift”) dos tipos de fibras musculares do ELD dos animais EAE, de IIB a IIA. Isso levou esse músculo a apresentar características de músculo lento, dentre as quais uma maior resistência (menor fadiga) à estimulação tetanizante.

REFERÊNCIAS*

1. Trapp BD, Nave KA. Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder? *Annu Rev Neurosci.* 2008;31:247-69.
2. Compston A. *McAlpine's Multiple Sclerosis*. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; 2006.
3. Callegaro D, Lino AMM, Marchiori PE. Esclerose Múltipla e outras Doenças Desmielinizantes de Sistema Nervoso Central. In: Martin; MdA et al; editores. *Clínica Médica*. 6 edição. São Paulo: Manole; 2009.p 450-477.
4. Stuve O, Zamvil SS. Doenças neurológicas In: Parshow TG, Stetes DP, Terr AL, Inbodem JB, editores. *Imunologia Clínica*. 10ª ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 2001. p. 445-58.
5. Sadovnick AD. European Charcot Foundation Lecture: the natural history of multiple sclerosis and gender. *J Neurol Sci.* 2009;286(1-2):1-5.
6. Hauser S, Goodin D. Multiple Sclerosis and other demyelinating diseases. In: Kasper D, Fauci A, Longo D, Braunwald E, Hauser S, Jameson J, editors. *Harrison's principles of internal medicine*. 16 th. New York: MacGraw-Hill; 2005. p. 2461-71.
7. Browne P, Chandraratna D, Angood C, Tremlett H, Baker C, Taylor BV, Thompson AJ. Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity.2014; 83 (11):1022-4.
8. Scarisbrick IA, Rodriguez M. Hit-Hit and hit-Run: viruses in the playing field of multiple sclerosis. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2003;3(3):265-71.
9. Lossius A, Johansen JN, Torkildsen Ø, Vartdal F, Holmøy T. Epstein-Barr virus in systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and multiple sclerosis—association and causation. *Viruses.* 2012;4(12):3701-30.
- 10.Hellings N, Raus J, Stinissen P. Insights into the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Immunol Res.* 2002;25(1):27-51.
- 11.Lassmann H. The pathologic substrate of magnetic resonance alterations in multiple sclerosis. *Neuroimaging Clin N Am.* 2008;18(4):563-76.
- 12.Morales Y, Parisi JE, Lucchinetti CF. The pathology of multiple sclerosis: evidence for heterogeneity. *Adv Neurol.* 2006;98:27-45.
13. Lassmann H. Review: the architecture of inflammatory demyelinating lesions: implications for studies on pathogenesis. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2011;37(7):698-710.
14. Newcombe J, Hawkins CP, Henderson CL, Patel HA, Woodroffe MN, Hayes GM, et al. Histopathology of multiple sclerosis lesions detected by magnetic resonance imaging in

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

unfixed postmortem central nervous system tissue. *Brain*. 1991;114 (Pt 2):1013-23.

15. Brück W, Porada P, Poser S, Rieckmann P, Hanefeld F, Kretzschmar HA, et al. Monocyte/macrophage differentiation in early multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol*. 1995;38(5):788-96.

16. Hu W, Lucchinetti CF. The pathological spectrum of CNS inflammatory demyelinating diseases. *Semin Immunopathol*. 2009;31(4):439-53.

17. Lucchinetti CF, Bruck W, Rodriguez M, Lassmann H. Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity on pathogenesis. *Brain Pathol*. 1996 Jul;6(3):259-74.

18. Chard D, Miller D. Grey matter pathology in clinically early multiple sclerosis: evidence from magnetic resonance imaging. *J Neurol Sci*. 2009;282(1-2):5-11.

19. Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mörk S, Bö L. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 1998;338(5):278-85.

20. Vogt J, Paul F, Aktas O, Müller-Wielsch K, Dörr J, Dörr S, et al. Lower motor neuron loss in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann Neurol*. 2009;66(3):310-22.

21. Stromnes IM, Goverman JM. Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc*. 2006;1(4):1810-9.

22. Hurst EW. The Effects of the Injection of Normal Brain Emulsion into Rabbits, with Special Reference to the Aetiology of the Paralytic Accidents of Antirabic Treatment. *J Hyg (Lond)*. 1932;32(1):33-44.

23. Rivers TM, Schweitzer FF. Vaccination of monkeys and laboratory workers against psittacosis. *J Exp Med*. 1934;60(2):211-38.

24. Rivers TM, Schwentker FF. Encephalomyelitis accompanied by myelin destruction experimentally produced in monkeys. *J Exp Med*. 1935;61(5):689-702.

25. Kabat EA, Wolf A, Bezer AE. Rapid production of acute disseminated encephalomyelitis in rhesus monkeys by injection of brain tissue with adjuvants. *Science*. 1946;104(2703):362.

26. Baxter AG. The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(11):904-12.

27. Olsson T, Dahlman I, Wallström E, Weissert R, Piehl F. Genetics of rat neuroinflammation. *J Neuroimmunol*. 2000;107(2):191-200.

28. Mix E, Meyer-Rienecker H, Zettl UK. Animal models of multiple sclerosis for the development and validation of novel therapies - potential and limitations. *J Neurol*. 2008;255 Suppl 6:7-14.

29. Smith PA, Heijmans N, Ouwerling B, Breij EC, Evans N, van Noort JM, et al. Native myelin oligodendrocyte glycoprotein promotes severe chronic neurological disease and demyelination in Biozzi ABH mice. *Eur J Immunol*. 2005;35(4):1311-9.
30. Delarasse C, Smith P, Baker D, Amor S. Novel pathogenic epitopes of myelin oligodendrocyte glycoprotein induce experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *Immunology*. 2013;140(4):456-64.
31. Mayer MC, Meinl E. Glycoproteins as targets of autoantibodies in CNS inflammation: MOG and more. *Ther Adv Neurol Disord*. 2012;5(3):147-59.
32. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011. 592p.
33. Bjartmar C, Kidd G, Mörk S, Rudick R, Trapp BD. Neurological disability correlates with spinal cord axonal loss and reduced N-acetyl aspartate in chronic multiple sclerosis patients. *Ann Neurol*. 2000;48(6):893-901.
34. Ferguson B, Matyszak MK, Esiri MM, Perry VH. Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain*. 1997;120 (Pt 3):393-9.
35. Kornek B, Storch MK, Weissert R, Wallstroem E, Stefferl A, Olsson T, et al. Multiple sclerosis and chronic autoimmune encephalomyelitis: a comparative quantitative study of axonal injury in active, inactive, and remyelinated lesions. *Am J Pathol*. 2000;157(1):267-76.
36. Blamire AM, Cader S, Lee M, Palace J, Matthews PM. Axonal damage in the spinal cord of multiple sclerosis patients detected by magnetic resonance spectroscopy. *MagnReson Med*. 2007; 58 (5):880-5.
37. Walter F, Boron, ELB. *Medical physiology: a cellular and molecular approach*. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005. P 1319.
38. Aires M de Melo. *Fisiologia*. 4ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2012.1335 p.
39. Silverthorn, DU. *Fisiologia Humana: uma abordagem integrada*. 2ª ed. Barueri: Manole; 2003. 816p.
40. Maddocks, M, Shrikrishna, D, Vitoriano S, Natanek SA , Tanner RJ, Hart N , Kemp PR, Moxham J, I. Polkey M I, Hopkinson NS. Skeletal muscle adiposity is associated with physical activity, exercise capacity and fibre shift in COPD. *Eur Respir J*. 2014; 44: 1188–98.
41. Koeppen BM, Stanton BA. *Berne e Ley Fisiologia*. 6ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2009. 844p.
42. Rang HP, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. Transmissão colinérgica In: Rang HP, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G, Rang & Dale *Farmacologia*. 8ª ed. Elsevir; 2016. p 155-176.

43. Gallacci, M.; Oliveira, A.C. Pre- and post-synaptic effects involved in the pancuronium induced tetanic fade of the rat muscle. *Pharmacology*, 234: 34-45, 1994.
44. Ching, L.H., Serra, C.S.M., Nascimento, D.C. de Oliveira, M.J., Oliveira, A.C. Differential effects of neuromuscular blockers on twitches and tetani in the isolated rat muscle: a multiple comparison study using simultaneous confidence intervals. *Fund. Clin. Pharmacol.*, 22: 511-6, 2008.
45. Basso AS, Frenkel D, Quintana FJ, Costa-Pinto FA, Petrovic-Stojkovic S, Puckett L, et al. Reversal of axonal loss and disability in a mouse model of progressive multiple sclerosis. *J Clin Invest.* 2008;118(4):1532-43.
46. Miyabara EH¹, Aoki MS, Soares AG, Saltao RM, Vilicev CM, Passarelli M, Scanlan TS, Gouveia CH, Moriscot AS. Thyroid hormone receptor-beta-selective agonist GC-24 spares skeletal muscle type I to II fiber shift. *Cell Tissue Res.* 2005 Aug;321(2):233-41.
47. Vieira S. *Bioestatística: Tópicos avançados*. Elsevier; 2010. 278p.
48. Stills HF. Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. *ILAR J.* 2005;46(3):280-93.
49. Awate S, Babiuk LA, Mutwiri G. Mechanisms of action of adjuvants. *Front Immunol.* 2013;4:114.
50. Billiau A, Matthys P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *J Leukoc Biol.* 2001;70(6):849-60.
51. Barbutto JAM. Imunidade Celular. In: Vaz C; Calich V. *Imunologia*. Revinter; 2001.p. 179-93.
52. Chen X, Winkler-Pickett RT, Carbonetti NH, Ortaldo JR, Oppenheim JJ, Howard OM. Pertussis toxin as an adjuvant suppresses the number and function of CD4+CD25+ T regulatory cells. *Eur J Immunol.* 2006;36(3):671-80.
53. Yadav R, Bhowmick S, Gorecki P, O'Rourke J, Cone RE. Paradoxical effect of pertussis toxin on the delayed hypersensitivity response to autoantigens in mice. *PLoS One.* 2010;5(8):e11983.
54. Berard JL, Wolak K, Fournier S, David S. Characterization of relapsing-remitting and chronic forms of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *Glia.* 2010;58(4):434-45.