

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

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.

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).

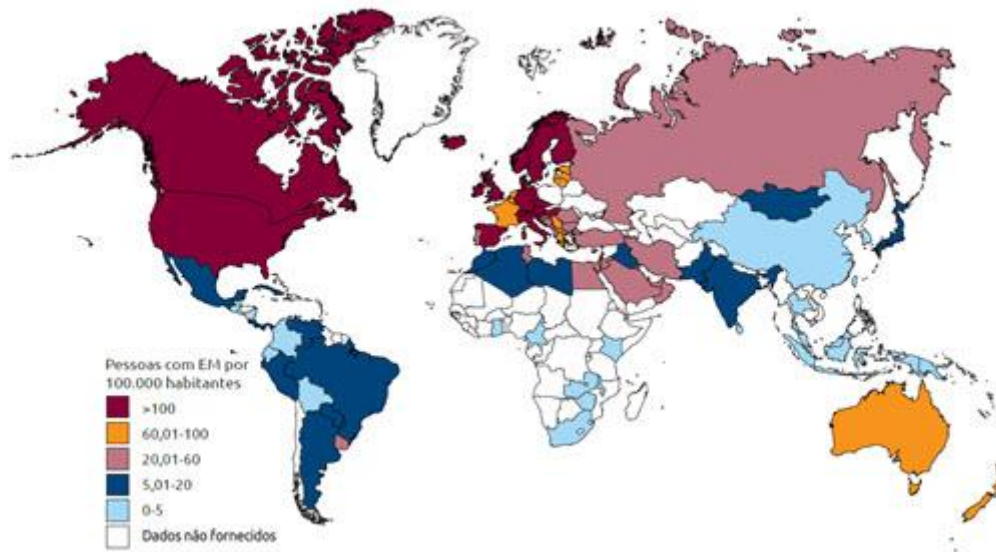
1.5 Esclerose Múltipla

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 epítopos 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 oligodendrócitos (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
Oligodendroglíopatia 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).

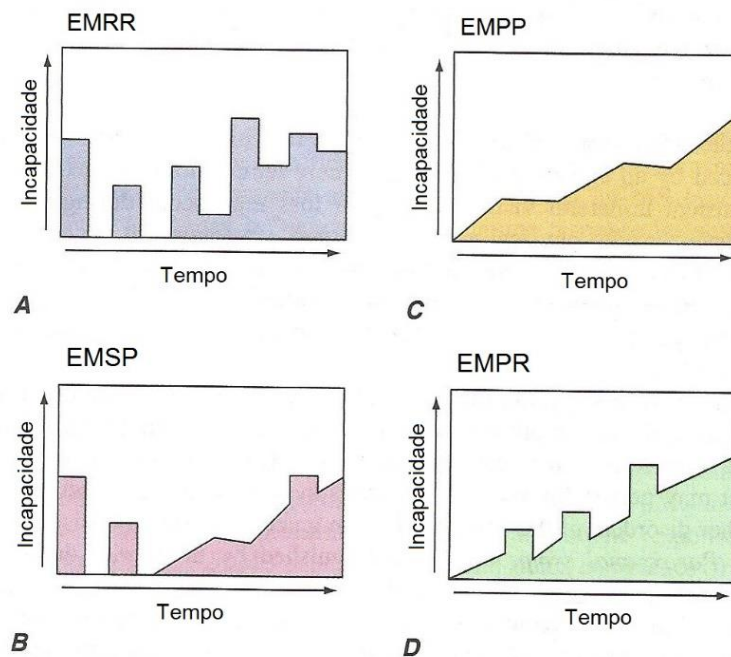
Sentindo a necessidade de chegar a um consenso quanto aos tipos clínicos da EM, a Sociedade Nacional de Esclerose Múltipla dos EUA, reuniu em 1996 clínicos e pesquisadores com essa finalidade, tendo a EM sido classificada em quatro tipos clínicos:

- 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 sadios 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 conseqüentemente, 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 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, Nataneck 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. Barbuto 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.