

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR

DAVID HENRIQUE RODRIGUES

Estudo do papel do fator ativador plaquetário na encefalomielite autoimune experimental

Orientador: Antônio Lúcio Teixeira

Co-orientadora: Vanessa Pinho

Belo Horizonte
2010

DAVID HENRIQUE RODRIGUES

Estudo do papel do fator ativador plaquetário na encefalomielite autoimune experimental

Tese apresentada ao Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular

Orientador: Antônio Lúcio Teixeira

Co-orientadora: Vanessa Pinho

Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
Minas Gerais, Brasil
2010

Agradecimentos

Aos colegas da pós-graduação: Paula, André, Ralph, Sarah, Samyra, Guilherme, Héder, Bárbara, Fabrício, Luana, Maria, Geraldo, Fúlvia.

Agradeço a todo o laboratório de Imunofarmacologia: Larissa, Maria Clara, Ana Paula, Camila, Juliana, Cris, Elisão, Daniel Mansur, Daniel Cisalpino, Rodrigo, Flavão, Flopes, Fernando, Remo, Gustavo, Bráulio, Fernanda Coelho, Fernanda Rocha, Deusimar, Val, Vanessa Mendonça, Débora Valadão, Débora Amaral, Mila, Dani Souza, Dani Sachs, Landa, Tarcília, Silvana, Celso, Kátia, Lívia, Luciana.

Aos que participaram mais ativamente deste trabalho: Caio, Aline, Roberta, Milene, Norinne.

Ao professor Mauro Teixeira; ao professor Helton Reis; à professora Rosa Arantes; à minha co-orientadora professora Vanessa Pinho.

Ao meu orientador Antônio Lúcio.

Especialmente à família, meus avós Devanir, Derly, Isaudina e Daurora; minha mãe Ivani, meu pequeno irmão Hugo, minha irmã Bárbara e meu pai Eloisio e sua mulher Lucilene. E muito especial à Marcinha.

Resumo

A esclerose múltipla (EM) é uma doença que provoca perda de mielina dos neurônios do sistema nervoso central (SNC). Ela acomete adultos jovens e leva a disfunções motoras, como paralisias dos membros superiores e inferiores, e disfunções sensitivas. Os mecanismos fisiopatológicos e etiopatogênicos ainda não estão bem esclarecidos e os tratamentos disponíveis não alteram significativamente o prognóstico. A encefalomielite autoimune experimental (EAE) é um dos modelos animais utilizados para o estudo da doença; pela sua semelhança com a EM. Nesse contexto, mediadores inflamatórios, como o fator ativador plaquetário (PAF), podem ter um papel fundamental no estabelecimento da condição neuroinflamatória.

Assim, o objetivo deste estudo foi investigar o papel desempenhado por mediadores inflamatórios, especialmente o PAF na EAE. Foram avaliados adesão e rolamento de leucócitos em camundongos deficientes para o receptor de PAF (PAFR^{-/-}) submetidos à EAE, bem como parâmetros clínicos, comportamentais, histológicos e moleculares nesses animais.

Verificou-se que animais deficientes para o receptor de PAF desenvolvem EAE mais branda que os animais selvagens. Análises histopatológicas revelaram menor infiltrado inflamatório nos animais PAFR^{-/-} e presença de leucócitos polimorfonucleares nestes animais, em contraste aos animais selvagens que apresentaram infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear. Os níveis de moléculas pró-inflamatórias no SNC de animais PAFR^{-/-} também foram menores que nos animais WT, indicando que havia poucos estímulos à migração de células mononucleares nestes animais. Entretanto, a adesão e o rolamento de células na microvasculatura cerebral, passos essenciais na migração celular, eram semelhantes nos animais PAFR^{-/-} quando comparados aos animais WT. A ausência de células CD4⁺ e de células produtoras de IL-17 nos animais PAFR^{-/-} confirmou a deficiência em parâmetros pró-inflamatórios nestes animais.

Paralelamente, foram investigados parâmetros comportamentais em animais induzidos com EAE. Entretanto, não foram encontradas alterações significativas em memória e ansiedade nos animais com EAE nem antes do início dos sinais clínicos, nem após a remissão da EAE.

Assim, neste estudo foi demonstrado que o PAF exerce um papel fundamental no processo neuroinflamatório deflagrado durante a EAE, provavelmente relacionado aos tipos de células que invadem o SNC.

Abstract

Multiple sclerosis (MS) is a disease that causes myelin destruction in the central nervous system (CNS) neurons. It affects young adults and leads to motor dysfunctions, like front and hind limbs paralysis and sensitive dysfunctions. The pathophysiological and etiopathogenic mechanisms are still not well understood and available treatments do not alter prognosis significantly. The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is one of the animal models used for the study of the disease, due to its similarity with MS. In this context, inflammatory mediators like platelet activating factor (PAF), could have an essential role in the establishment of the neuroinflammatory condition.

Thus, the objective of this study was to investigate the role of inflammatory mediators, especially PAF, in EAE. It was evaluated the rolling and adhesion of leukocytes in mice deficient for the receptor of PAF (PAFR^{-/-}) induced with EAE, as well as clinical, behavioural, histologic and molecular parameters in these mice.

PAFR^{-/-} animals develop a milder EAE when compared to wild type (WT) mice. Histopathologic analyses revealed fewer inflammatory infiltrates in PAFR^{-/-} animals and the presence of polymorphonuclear leukocytes in these animals, contrasting with WT animals that presented an inflammatory infiltrate composed predominantly of mononuclear cells. Levels of proinflammatory molecules in the CNS of PAFR^{-/-} animals were also lower than WT animals, indicating a diminishment in the stimuli to the migration of mononuclear cells in these animals. However, adhesion and rolling of cells in brain microvasculature, which constitute essential steps in cellular migration, were similar in PAFR^{-/-} animals when compared to WT. Absence of CD4⁺ cells and IL-17 producer cells in PAFR^{-/-} animals confirmed the deficiency in proinflammatory parameters in these mice.

In parallel, behavioural parameters were investigated in EAE-induced animals. Nonetheless, no significant changes were found in memory and anxiety in mice with EAE either before the onset of clinical signs or after EAE remission.

In conclusion, this study demonstrated that PAF exerts a fundamental role in the neuroinflammatory process during EAE, probably related to the types of cells that invade the CNS.

Lista de Abreviaturas

ANOVA = análise de variância
BHE = barreira hematoencefálica
BSA = bovine serum albumin / albumina de soro bovino
CA1 = corno de Amon 1
CaCl₂ = cloreto de cálcio
CD = cluster of differentiation / grupo de diferenciação
CETEA = Comitê de Ética em Experimentação Animal
CFA = complete Freund adjuvant / adjuvante completo de Freund
CSF = cerebrospinal fluid / fluido cerebrospinal
EAE = encefalomielite autoimune experimental
ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay
EM = esclerose múltipla
FITC = fluorescein isothiocyanide / isotiocianato de fluoresceína
H₂SO₄ = ácido sulfúrico
HE = hematoxilina e eosina
IFN- γ = interferon gama
IgE = imunoglobulina E
IL = interleucina
KCl = cloreto de potássio
LPS = lipopolissacarídeos
MCP-1 = monocyte chemoattractant protein 1 / proteína quimioatraente de monócitos
MgCl₂ = cloreto de magnésio
MIG = monokine induced by gamma-Interferon / monocina induzida por interferon gama
MIP-1 α = macrophage inflammatory protein-1-alpha / proteína inflamatória de macrófago 1 alfa
MOG = myelin oligodendrocyte glycoprotein (glicoproteína da mielina de oligodendrócito)
Na₂HPO₄.12H₂O = fosfato de dissódio
NaCl = cloreto de sódio
NAG = N-acetil- β -D-glicosaminidase
NaHCO₃ = bicarbonato de sódio
OD = optic density / densidade óptica
OPD = o-phenylenediamine / o-fenilenodiamina
PAF = platelet activating factor / fator ativado plaquetário
PAFR = PAF receptor / receptor de PAF
PBS = phosphate buffered saline / salina de fosfato tamponada
PE = phycoerythrin / ficoeritrina
PI3K γ = fosfatidilinositol-3-cinase gama
PMSF = phenylmethylsulfonyl fluoride / fluoreto de fenilmetilsulfonila
RANTES = regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted / regulada sob ativação, secretada e expressa por célula T normalmente
RPMI = Roswell Park Memorial Institute / Instituto Parque Memorial Roswell
Th = T helper cells / células T auxiliares
TNF- α = tumor necrosis factor alpha / fator de necrose tumoral alfa
WT = wild type / tipo selvagem

Lista de Figuras

Figura 1 Moléculas que participam da cascata de ancoragem, rolamento e adesão de leucócitos ao endotélio vascular. Extraído de Luster <i>et al.</i> (2005).	22
Figura 1.2 PAF e a sinalização de seu receptor.....	25
Figura 2 Aspecto histológico panorâmico das medulas de animais WT induzidos com EAE. Observa-se intenso infiltrado de células próximo à meninge (seta) após 14 dias da indução de EAE. Aumento: 40X.....	45
Figura 3 Aspecto histológico panorâmico das medulas de animais PAFR ^{-/-} induzidos com EAE. Observa-se intenso infiltrado de células próximo à meninge (seta) após 14 dias da indução de EAE, em quantidade similar aos animais WT. Aumento: 40X.	45
Figura 4 Medula espinhal corada com H&E de animais WT com EAE. Após 14 dias de indução, os animais WT apresentam infiltrados inflamatórios marcantes, principalmente de células mononucleares, tanto no parênquima quanto em regiões perivasculares. 400X.	45
Figura 5 Medula espinhal corada com H&E de animais PAFR ^{-/-} com EAE. Após 14 dias de indução, os animais PAFR ^{-/-} apresentam infiltrados inflamatórios em quantidade semelhante aos WT. No entanto, as células infiltrantes são predominantemente polimorfonucleares, como neutrófilos e eosinófilos 400X.	45

Lista de Tabelas

Tabela 1 Modelos de EAE ativa e passiva comumente utilizados e suas aplicações.....	17
Tabela 2 Diferenças imunológicas entre camundongos e humanos relevantes para o teste de terapias para esclerose múltipla	19

Lista de Gráficos

Gráfico 1 Desenvolvimento de sinais motores após indução de EAE em animais WT e PAFR ^{-/-} .	42
Gráfico 2 Perda de massa em animais após indução de EAE.	43
Gráfico 3 Atividade da enzima NAG no tronco encefálico de camundongos WT e PAFR ^{-/-} na fase aguda da EAE.	47
Gráfico 4 Visualização de interações leucócito-endotélio no pico da EAE.	48
Gráfico 5 Produção de IL17, CCL2 e CCL5 no sistema nervoso central de camundongos com EAE.	50
Gráfico 6 Gráficos dot plot e formação dos “gates” na análise de citometria de fluxo.	52
Gráfico 7 Efeito da EAE no consumo de sacarose 2%.	53
Gráfico 8 Tempo nos braços abertos do labirinto elevado em cruz de animais WT e PAFR ^{-/-} .	54
Gráfico 9 Labirinto elevado em cruz de animais WT e PAFR ^{-/-} machos.	55
Gráfico 10 Evolução clínica da EAE após 60 dias de imunização (fase crônica).	56
Gráfico 11 Tempo nos braços abertos do labirinto elevado em cruz na fase crônica da EAE.	56
Gráfico 12 Tempo de exploração do novo objeto de animais controles e EAE após 60 dias de indução.	57
Gráfico 13 Desenvolvimento de sinais motores após indução de EAE em animais WT e PAFR ^{-/-} .	79
Gráfico 14 Desenvolvimento de sinais motores após indução de EAE em animais WT e PAFR ^{-/-} .	79

Sumário

1.	Introdução.....	13
1.1.	<i>Esclerose múltipla</i>	13
1.2.	<i>Modelo de encefalomielite auto-imune experimental (EAE)</i>	15
1.2.1.	<i>Introdução</i>	15
1.2.2.	<i>História da EAE</i>	16
1.2.3.	<i>Modelo de EAE induzido pela Glicoproteína da Mielina do Oligodendrócito (MOG): vantagens e limitações</i>	18
1.3.	<i>Recrutamento de leucócitos para o sistema nervoso central e o papel das quimiocinas no processo</i>	20
1.4.	<i>Vias de acesso ao sistema nervoso central</i>	22
1.4.1.	<i>A barreira hematoencefálica</i>	22
1.4.2.	<i>O plexo coróide</i>	24
1.5.	<i>Etiopatogênese da EAE</i>	24
1.6.	<i>Fator Ativador Plaquetário</i>	25
1.7.	<i>Ansiedade</i>	28
1.8.	<i>Memória</i>	28
2.	Objetivos	30
2.1.	<i>Objetivo geral:</i>	30
2.2.	<i>Objetivos específicos:</i>	30
3.	Materiais e métodos	31
3.1.	<i>Animais</i>	31
3.2.	<i>Reagentes e indução do EAE</i>	31
3.2.1.	<i>Escore clínico 1</i>	31
3.2.2.	<i>Escore clínico 2</i>	32
3.2.3.	<i>Escore clínico 3</i>	32
3.3.	<i>Testes comportamentais</i>	34
3.3.1.	<i>Labirinto em Cruz Elevado (Elevated Plus Maze)</i>	34
3.3.2.	<i>Teste de Memória de Reconhecimento de Objetos (Object Recognition Memory)</i>	34

3.4.	<i>Microscopia intravital no cérebro do camundongo</i>	35
3.5.	<i>Medida dos níveis de citocinas e quimiocinas no soro e cérebro por ELISA</i>	36
3.5.1.	<i>Preparo de homogenato de cérebro de camundongo</i>	36
3.5.2.	<i>Determinação de citocinas por ELISA</i>	37
3.6.	<i>Análise por citometria de fluxo</i>	38
3.7.	<i>Histologia</i>	38
3.8.	<i>Técnica para dosagem de atividade de N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG) no tecido cerebral</i>	39
3.9.	<i>Análise estatística</i>	40
4.	<i>Resultados</i>	41
4.1.	<i>Resultados utilizados na publicação do artigo intitulado “Absence of PAF receptor alters cellular infiltrate but not rolling and adhesion of leukocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis”</i>	41
4.1.1.	<i>Animais deficientes para o receptor de PAF desenvolvem EAE menos grave</i>	41
4.1.2.	<i>Animais PAFR^{-/-} apresentam distintos infiltrados inflamatórios no sistema nervoso central após indução de EAE</i>	43
4.1.3.	<i>Não há aumento de macrófagos em animais PAFR^{-/-} na fase aguda da EAE</i>	47
4.1.4.	<i>Rolamento e adesão de células em animais PAFR^{-/-} são similares aos animais WT</i>	48
4.1.5.	<i>Citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias não estão aumentadas nos animais PAFR^{-/-} induzidos com EAE</i>	49
4.1.6.	<i>Células CD4⁺ e células secretoras de IL-17 estão reduzidas no cérebro de animais PAFR^{-/-} induzidos com EAE</i>	51
4.2.	<i>Resultados utilizados no artigo aceito para publicação intitulado “Behavioral investigation of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis”</i>	53
4.2.1.	<i>Não há alteração no consumo de sacarose 2% após indução de EAE</i>	53
4.2.2.	<i>Ansiedade nos animais PAFR^{-/-} é menor e é revertida após indução de EAE</i>	53
4.2.3.	<i>Ansiedade de animais PAFR^{-/-} machos sem doença é semelhante a animais WT</i>	54
4.2.4.	<i>Não há alteração na ansiedade em animais WT induzidos com EAE na fase crônica</i>	55
4.2.5.	<i>Não há alteração na memória na fase crônica da EAE</i>	56
5.	<i>Discussão</i>	58

5.1. Discussão de resultados publicados no artigo científico intitulado “Absence of PAF receptor alters cellular infiltrate but not rolling and adhesion of leukocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis”	58
5.2. Discussão dos resultados mostrados no artigo aceito para publicação intitulado: “Behavioral investigation of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis”	62
6. Conclusões	65
7. Referências	66
8. Produção científica no período	77
9. Anexos	79
9.1. Anexo I – gráficos de avaliação clínica.	79
9.2. Anexo II - artigo científico publicado.....	80
9.3. Anexo III - Artigo aceito para publicação.....	89

1. Introdução

1.1. Esclerose múltipla

A esclerose múltipla é a doença desmielinizante do sistema nervoso central mais comum e para a qual os tratamentos atuais têm efetividade limitada. Em média, a idade de acometimento é aos 30 anos e, com exceção de traumas, esclerose múltipla permanece sendo a mais freqüente causa de incapacidade neurológica em adultos jovens (Al-Oamishi *et al.*, 1999). No Brasil, a prevalência é variável, de 1,36 casos por 100 000 nas áreas equatoriais (Ferreira *et al.*, 2004) a 15 por 100 000 na região sudeste (Fragoso e Fiore, 2005; Callegaro *et al.*, 2001).

As primeiras descrições clínico-patológicas da esclerose múltipla foram realizadas por Charcot, no entanto, foram Robert Carswell e Jean Cruveilhier os primeiros a documentar as lesões patológicas (Moreira *et al.*, 2002). A doença é caracterizada pela ocorrência de lesões desmielinizantes inflamatórias focais na substância branca encefálica ou na medula espinhal, que são responsáveis pela determinação dos sintomas clínicos observados nos pacientes (Raine *et al.*, 1997; Compston *et al.*, 2005). Os sintomas mais comuns incluem déficits motores (paralisias) e sensitivos (hipo ou anestésias), alterações visuais e esfinterianas. Todos esses sintomas, ao gerarem incapacidade funcional, têm impacto significativo na qualidade de vida do indivíduo.

A progressão clínica da doença é avaliada analisando-se o acúmulo de debilidade neurológica com ferramentas metodológicas padronizadas, incluindo a escala de Kurtzke, ou EDSS, do inglês Expanded Disability Status Scale (Kurtzke, 1983).

Não há dados nacionais sobre o impacto econômico da esclerose múltipla, mas o gasto com as drogas imunomoduladoras para o tratamento da doença consome parcela significativa do orçamento das Secretarias de Saúde dos Estados destinado à compra de medicamentos. Em Minas Gerais, a Secretaria de Saúde gastou no ano de 2001 R\$4.683.780,00 em medicamentos imunomoduladores para a esclerose múltipla (Lana-Peixoto *et al.*, 2002). Neste valor, não estão contabilizados os prejuízos da incapacidade produtiva do indivíduo. Assim, justificam-se os estudos visando um maior entendimento e a busca de terapias para a esclerose múltipla.

Existem três tipos principais de curso clínico da esclerose múltipla: surto-remissão, que é a mais freqüente (85% dos casos) e caracterizada por surtos isolados e subseqüentes períodos de

estabilidade clínica; secundária progressiva, que acontece após vários surtos com a debilidade clínica aumentando continuamente; e primária progressiva, em que os pacientes desenvolvem déficits clínicos progressivos e contínuos desde o primeiro surto (Friese *et al.*, 2006).

Exames *post-mortem* identificaram quatro principais tipos de lesões patológicas no cérebro de pacientes com esclerose múltipla. As lesões do tipo I e II constituem desmielinização associada a linfócitos T e macrófagos, com excesso de deposição de anticorpos nas lesões do tipo II quando comparadas às do tipo I. Ambas as lesões ocorrem tipicamente em regiões perivasculares. As lesões do tipo III e IV apresentam distrofia e apoptose de oligodendrócitos, características ausentes nas lesões dos tipos I e II. Outra característica que diferencia lesões tipo III e IV das lesões tipo I e II é o fato de que, naquelas, a presença de macrófagos é menos intensa e não segue o padrão perivascular que ocorre nas últimas. Além disso, as lesões do tipo IV foram encontradas exclusivamente em pacientes com esclerose múltipla do tipo primário-progressivo (Luchinetti *et al.*, 2000).

É possível que a doença se inicie a partir de células T autorreativas para antígenos da mielina (como, por exemplo, glicoproteína de mielina de oligodendrócito). A esclerose múltipla é caracterizada essencialmente por inflamação no sistema nervoso central, sobretudo na substância branca. Esse processo inflamatório está associado ao influxo de células mononucleares no sistema nervoso central em resposta a uma variedade de estímulos teciduais, que incluem citocinas inflamatórias e quimiocinas. As células inflamatórias levam à perda da mielina, disfunção da integridade dos oligodendrócitos e, posteriormente, perda axonal. Esses eventos são, em última instância, os responsáveis pelos sintomas e pela incapacidade funcional relacionada à doença. Portanto, o entendimento do processo inflamatório, especialmente da migração de células para o sistema nervoso central, é fundamental na compreensão da esclerose múltipla (Al-Oamishi *et al.*, 1999).

Embora os eventos que ocasionem a doença não estejam totalmente compreendidos, a maior parte das evidências leva a crer numa etiologia autoimune associada a fatores ambientais e a predisposições genéticas ainda incertas. Os fatores ambientais que provavelmente estão envolvidos incluem baixa exposição à luz solar, deficiência de vitamina D, exposição ao vírus Epstein-Barr e tabagismo (Ramagopalan *et al.*, 2010). Fatores genéticos tem sido implicados na esclerose múltipla, especialmente relacionados aos genes para HLA, receptor de IL7 e receptor de IL2 (Svejgaard *et al.*, 2008). A predisposição genética parece ter grande influência na probabilidade

de desenvolver esclerose múltipla, uma vez que quanto mais próximo o parentesco com um paciente, maiores as chances de se desenvolver a doença (Sadovnick *et al.*, 2009). No entanto, um estudo recente em gêmeos idênticos discordantes para a doença não detectou evidências genéticas ou epigenéticas que sejam determinantes para o aparecimento da esclerose múltipla (Baranzini *et al.*, 2010).

1.2. Modelo de encefalomielite auto-imune experimental (EAE)

1.2.1. Introdução

São três os critérios básicos a serem seguidos para um modelo experimental satisfatório (Neumann *et al.*, 2011).

1. Validade de face: o que significa que o fenótipo do modelo é similar à síndrome humana que ele, supostamente, mimetiza;
2. Validade preditiva: a manipulação conhecida por influenciar a patologia humana (de uma forma positiva ou deletéria) terá efeitos comparáveis no modelo animal;
3. Validade de construto: com a qual as duas anteriores contribuem, pressupõe que uma doença humana e o modelo animal compartilham substratos patológicos comuns que podem explicar a patologia em ambos. Assim, permite a geração de uma teoria mecanística comum e de testes experimentais dos aspectos clínicos mais notáveis de uma doença qualquer.

Existem diversas estratégias laboratoriais que geram condições desmielinizantes, como, por exemplo, o uso crônico de cuprizona (Torkildsen *et al.*, 2008) e infecção por vírus de Theiler (Drescher e Sosnowska, 2008). Entretanto, a encefalomielite autoimune experimental (EAE) é um dos métodos mais utilizados, atualmente, para se estudar esclerose múltipla.

Os critérios listados acima aplicados à EAE mostram que este é um modelo atraente para o estudo da esclerose múltipla. Quanto à validade de face, o modelo apresenta um fenótipo similar à doença em humanos, pois gera fraqueza de membros. Em relação à validade preditiva, drogas que interferem com a progressão da doença na EAE também interferem com a progressão da doença na esclerose múltipla. Por fim, na validade de construto, tanto o modelo como a doença

apresentam a geração de uma resposta autoimune contra antígenos de mielina no sistema nervoso central, considerado, hoje, o principal mecanismo envolvido no início e progressão da esclerose múltipla (Glass *et al.*, 2010).

1.2.2. História da EAE

O modelo foi utilizado pela primeira vez em 1933 por Thomas Rivers (Epps, 2005), que administrou extratos de cérebro de coelho em macacos Rhesus. Rivers percebeu que os animais desenvolviam paralisia e esta condição era dependente da quantidade de mielina que havia no extrato aplicado no animal. A indução era bastante laboriosa, pois Rivers fazia cerca de 80 aplicações de extrato de cérebro por animal, durante um período de um ano. Alguns anos depois, Kabat e colaboradores (1946) utilizaram um adjuvante desenvolvido por Jules Freund. A partir daí, era necessária apenas uma injeção de extrato de cérebro para que a indução acontecesse (Epps, 2005).

Existem diversos modelos de EAE para diversas espécies, com destaque para os modelos em camundongos (Tabela 1).

Tabela 1 Modelos de EAE ativa comumente utilizados e suas aplicações

Espécie/ Linhagem	Estudos e aplicações	
	Peptídeos indutores da EAE	
C57BL/6	MOG ₃₅₋₅₅ ; OSP ₁₇₉₋₂₀₇ ; rNogo-66	Linhagem comumente usada para gerar animais transgênicos e há muitos animais <i>knock out</i> e transgênicos disponíveis; patogênese mediada por células CD4 ⁺ Th1/Th17; validação pré-clínica de compostos terapêuticos; dano mediado por células T CD8 ⁺
SJL/J	MOG ₉₂₋₁₀₆ ; PLP ₁₃₉₋₁₅₁ ; PLP ₁₇₈₋₁₉₁ ; PLP ₁₀₄₋₁₁₇ ; OSP ₅₇₋₇₂ ; MOBP ₃₇₋₆₀ ; MOBP ₁₅₋₃₆ ; MBP; MBP ₈₉₋₁₀₁ ; Nogo-66	Estudo dos mecanismos do surto; controle genético de doença autoimune; espalhamento de epítipo; desmielinização mediada por anticorpo; influência do gênero na autoimunidade; validação pré-clínica de compostos terapêuticos
Biozzi ABH	MOG, MOG ₁₋₂₂ ; MOG ₄₃₋₅₇ ; MOG ₁₃₄₋₁₄₈ ; PLP ₅₆₋₇₀ ; MBP ₂₁₋₃₅ ; MAG ₉₇₋₁₁₂ ; ab-crystallin ₁₋₁₆ ; NF-L; GFAP	Estudo dos mecanismos do surto; desmielinização mediada por anticorpos; validação pré-clínica de compostos terapêuticos
B10.PL e PL/J	MBP Ac ₁₋₁₁ ; MOG ₃₅₋₅₅	Estudo de Treg; mimetismo molecular e influências ambientais; mecanismos de tolerância; validação pré-clínica de compostos terapêuticos
C3H/HeJ	PLP ₂₁₅₋₂₃₂ , PLP	Dano mediado por células T CD8 ⁺ ; mecanismos de tolerância
Ratos Lewis	MBP; MBP ₂₉₋₈₄ ; MBP ₆₁₋₈₂ ; MBP ₈₀₋₁₀₅ ; MBP ₁₇₀₋₁₈₆ ; β -Synuclein ₉₃₋₁₁₁	Estudo de comportamento migratório de células T autoimunes; controle genético da autoimunidade, validação pré-clínica de compostos terapêuticos
Ratos DA, BN	MOG	Desmielinização mediada por anticorpos; mimetismo molecular; controle genético da autoimunidade
Macaco Rhesus (<i>Macaca mulatta</i>)	MBP; MOG ₃₄₋₅₆	Influência ambiental na autoimunidade no SNC; patologia axonal; desmielinização mediada por anticorpos; validação pré-clínica de compostos terapêuticos
Sagüi comum (<i>Callithrix jacchus</i>)	MOG; MOG ₁₄₋₃₆	Similar ao macaco Rhesus

1.2.3. Modelo de EAE induzido pela Glicoproteína da Mielina do Oligodendrócito (MOG): vantagens e limitações

O modelo utilizado neste trabalho envolve a proteína MOG. Suspeita-se do envolvimento dessa proteína em EAE desde 1976 quando Lebar e colaboradores argumentavam que a desmielinização observada em animais induzidos era mediada por anticorpos com reatividade para um componente da mielina, na época denominado M2 (Lebar *et al.*, 1976). Em 1984, Linington e colaboradores identificaram a proteína pela primeira vez, e logo ela foi associada aos anticorpos relatados pelo trabalho de Lebar (Linington *et al.*, 1984). Em 1995, Johns e colaboradores induziram EAE em ratos Lewis utilizando pela primeira vez a proteína MOG purificada, ao invés do extrato de cérebro. No ano seguinte, Ichikawa e colaboradores (1996) descobriram que o peptídeo 35-55 da proteína MOG era capaz de gerar anticorpos específicos de linfócitos B. A seguir, Slavin e colaboradores (1998) induziram a EAE utilizando o peptídeo MOG₃₅₋₅₅ em camundongos C57BL/6 (H2b), gerando uma condição de surto único e cronicamente paralisante e consolidando, assim, a indução através deste protocolo.

Há diversas semelhanças entre a EAE e a esclerose múltipla além da debilidade motora. A desmielinização e infiltrado inflamatório de células T CD4⁺, características encontradas no cérebro de pacientes com esclerose múltipla (Goverman, 2009), também são encontradas no modelo de EAE (Hjelmström *et al.*, 1998). Tal similaridade entre os dois quadros patológicos faz da EAE um modelo útil no estudo dos mecanismos fisiopatológicos da esclerose múltipla e, não obstante, valida a EAE como um modelo para o desenvolvimento de terapias.

No entanto, não é uma unanimidade considerar EAE como um modelo de esclerose múltipla. Isso porque, apesar de muitas semelhanças com aquela doença, a EAE possui diferenças importantes. Do ponto de vista farmacológico, dois medicamentos testados com sucesso em EAE falharam no tratamento de esclerose múltipla. Um deles é um bloqueador da integrina $\alpha_4\beta_1$. Este medicamento foi eficiente no tratamento dos modelos de EAE e também foi bastante eficaz em alguns pacientes, porém houve dois casos de desenvolvimento de leucoencefalopatia multifocal progressiva que vieram a óbito (Bartt, 2006). Por outro lado, algumas terapias para esclerose múltipla presentes no mercado foram desenvolvidas devido a seu êxito em atenuar a EAE, dentre as quais é importante citar o acetato de glatiramer (Ziemssen e Schrempf, 2007).

Tabela 2 Diferenças relevantes entre camundongos e humanos para o teste de terapias para esclerose múltipla

	<i>Camundongos</i>	<i>Humanos</i>
Gerais	Consanguíneo; homocigoto; pequena duração da vida; alta fecundidade; dieta fixa; livre de patógenos; ambiente limpo	Não-consanguíneo; heterocigoto; grande duração da vida; baixa fecundidade; dieta variada; carreadores de patógenos potenciais; acesso livre a novas infecções
EAE e esclerose múltipla	Pode ser monofásico; camundongos testados enquanto os epítomos estão espalhando	Diferentes subtipos, geralmente com surtos; epítomos provavelmente espalharam bem antes do diagnóstico;
Indução	Geralmente com CFA	Espontânea
Testando novas terapias	Indução de EAE estudada muito mais do que a doença em curso; apenas alguns camundongos testados	Centenas de pacientes; alguns efeitos colaterais são muito raros para serem observados em camundongos
Escrutínio	Menos detalhado	Detalhado, talvez não observada em camundongos
Acompanhamento	Apenas no curto prazo	Muitos anos ou durante toda a vida
Diferenças moleculares na resposta imune		
Resposta de células T	Frequentemente estereotipada	Geralmente se altera, mesmo para epítomos recorrentes
Linfócitos no sangue periférico	75-90%	30-50%
Expressão de CD4 ⁺	Linfócitos	Linfócitos, macrófagos
Expressão de CD8 ⁺	Linfócitos, células dendríticas	Linfócitos
Expressão de IL-10	T _h 2	T _h 1 e T _h 2
Resposta de IFN- γ	Não há diferenciação preferencial de Th	Promove resposta T _h 1
IL-4 e IFN- γ expressos por T _h	Exclusivamente um ou o outro	Promove resposta T _h 1
Expressão de CD28	Aproximadamente 100% de células T CD4 ⁺ e CD8 ⁺	Aproximadamente 80% de células T CD4 ⁺ , 50% de células T CD8 ⁺
Expressão de MHC classe II	Ausente nas células T e células endoteliais	Presentes em células T e células endoteliais
Expressão de CD52	Não encontrado em camundongos	Linfócitos
Sensibilidade a glicocorticóides	Grande	Pequena e variável

Extraído de Friese *et al.* (2006) com modificações.

Neste trabalho, optou-se por considerar EAE como modelo de esclerose múltipla, uma vez que os parâmetros de neuroinflamação investigados neste trabalho têm suma importância na etiopatogênese desta doença.

1.3. Recrutamento de leucócitos para o sistema nervoso central e o papel das quimiocinas no processo

Podem-se listar três rotas de entrada de leucócitos no sistema nervoso central. Migração do sangue para o fluido cerebrospinal através do plexo coróide ou através dos vasos das meninges para o espaço subaracnóideo; migração do sangue para o parênquima perivascular do cérebro; e migração do sangue para o parênquima perivascular da medula espinhal (Rebenko-Moll *et al.*, 2006).

A migração de leucócitos do sangue para o parênquima perivascular do cérebro é um processo que se inicia pela interação da célula com o endotélio do vaso, interação esta estimulada por quimiocinas, como dito anteriormente.

Quimiocinas, termo resultante da fusão de “citocinas quimiotáticas”, são uma grande família de pequenas proteínas básicas que exercem um amplo espectro de funções biológicas e patológicas. A demonstração *in vitro* de que uma molécula é uma quimiocina consiste no estímulo quimiotático de leucócitos de uma forma dependente da concentração da suposta quimiocina (Savarin-Vuaillet e Ransohoff, 2007). É comum a todas as quimiocinas descritas até o momento o fato de sua ação efetora depender da ligação da molécula a receptores de membrana acoplados à proteína G.

A subfamília CC é caracterizada pela presença de dois resíduos de cisteína sucessivos. Os membros desta que é a maior subfamília têm espectro de ação amplo e podem atrair monócitos, eosinófilos, basófilos, linfócitos T, células “natural killer” (NK) e células dendríticas. As quimiocinas da subfamília CXC recebem esta denominação pela interposição de um aminoácido (X) entre seus dois primeiros resíduos de cisteína e subdividem-se entre aquelas que possuem o motivo glutamato-leucina-arginina (ELR) e aquelas que não possuem. São utilizadas na quimiotaxia para neutrófilos (se também contiverem o motivo ELR) e para linfócitos e monócitos (se não apresentarem o motivo ELR). As quimiocinas C apresentam apenas dois dos quatro resíduos que ocorrem nas outras subfamílias e podem agir em linfócitos, mas não em neutrófilos ou monóci-

tos. A quimiocina da família CX3CL possui três aminoácidos entre os dois primeiros resíduos de cisteína e um domínio semelhante a mucina em sua extremidade C-terminal. Age como molécula de adesão ou quimioatraente para células T, células NK e fagócitos mononucleares (Savarin-Vuaillet e Ransohoff, 2007).

As quimiocinas desempenham diversas funções no sistema nervoso central além de seu papel nas respostas imunes. Por exemplo, o sistema CXCL1/CXCR2 controla o posicionamento de precursores de oligodendrócitos (Tsai *et al.*, 2002) e o sistema CXCL12/CXCR4 regula a migração neuronal e axonal durante o desenvolvimento (Li *et al.*, 2008).

A passagem de leucócitos da circulação sistêmica para o tecido é iniciada após algum sinal quimiotático recebido pela célula endotelial e pelo próprio leucócito. A liberação de quimiocinas no local da inflamação atinge o endotélio, provocando alteração da expressão de selectinas nas células endoteliais. Em consequência, há um ancoramento, ou “tethering” de leucócitos circulantes no endotélio vascular. A seguir, moléculas como VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Protein 1), no endotélio, e $\alpha_4\beta_1$, no leucócito permitem que o leucócito faça o “rolamento” no endotélio vascular. Quimiocinas que alcancem o endotélio e o leucócito induzirão a expressão de LFA-1 (Lymphocyte Function-Associated Antigen 1) neste e ICAM-1 (Inter-Cellular Adhesion Molecule 1) naquele, provocando adesão firme do leucócito ao endotélio. Este processo está resumido na figura 1.

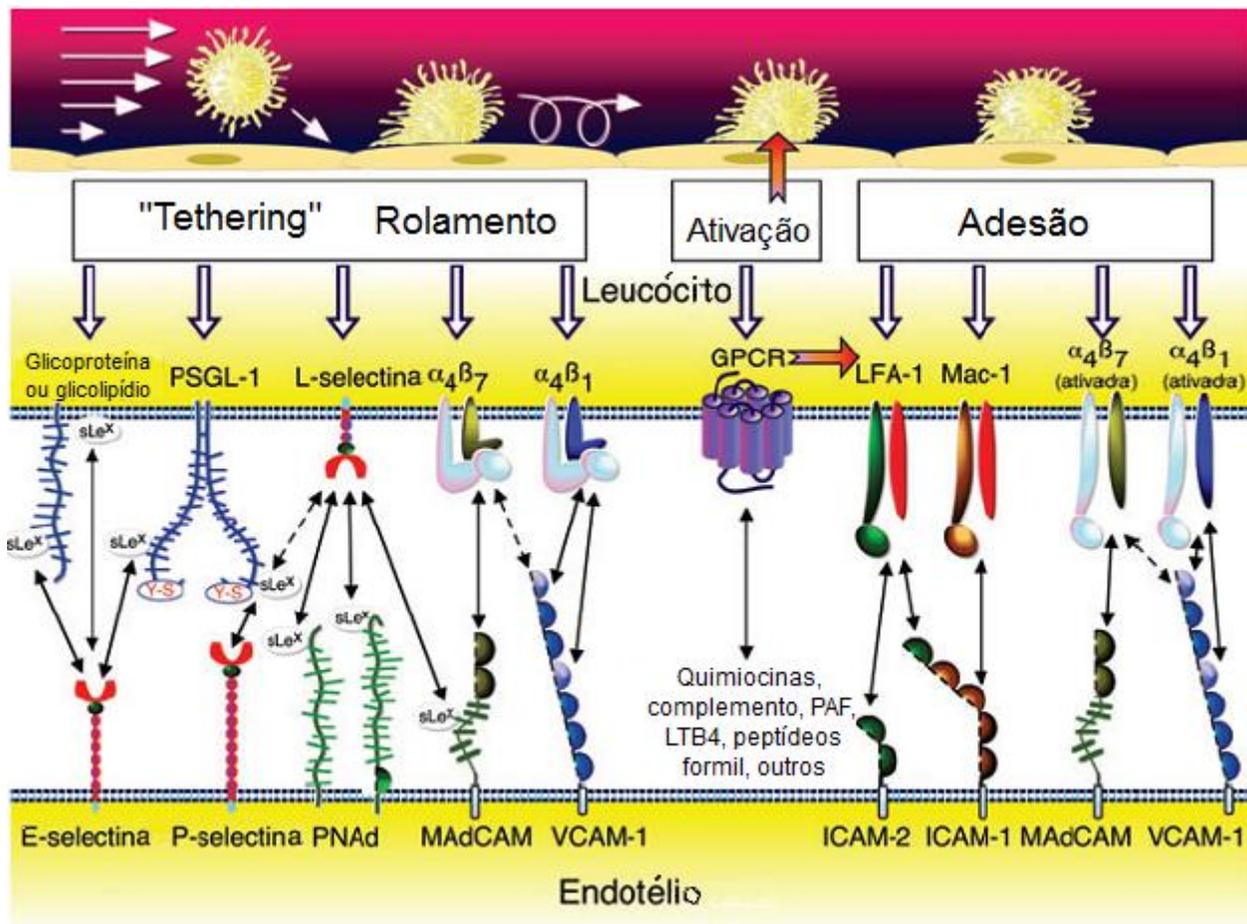


Figura 1 Moléculas que participam da cascata de ancoragem, rolamento e adesão de leucócitos ao endotélio vascular. Extraído de Luster *et al.* (2005) com modificações.

No SNC, o processo de migração celular envolve etapas semelhantes às supracitadas, porém, o endotélio vascular apresenta particularidades quando comparado ao restante do organismo.

1.4. Vias de acesso ao sistema nervoso central

1.4.1. A barreira hematoencefálica

A entrada de moléculas ou células no sistema nervoso central está condicionada à ação da barreira hematoencefálica (BHE), que consiste principalmente de células endoteliais unidas por junções oclusivas, astrócitos, membrana basal e pericitos, além dos neurônios que estão em proximidade física com o endotélio. Todos estes elementos são parte da unidade neurovascular. Sob condições fisiológicas, a BHE garante o suprimento constante de nutrientes (oxigênio, glicose e

outras substâncias) para as células do cérebro e direciona as células inflamatórias (Persidsky *et al.*, 2006). As junções oclusivas impedem a entrada de moléculas no parênquima cerebral, o que confere a menor permeabilidade intercelular no endotélio capilar do sistema nervoso central. Além disso, as células endoteliais possuem taxa diminuída de endocitose, o que limita também o tráfego de moléculas intracelular (Bellavance *et al.*, 2008)

Para que uma molécula consiga atravessar a BHE, ela deve pesar menos de 180Da e apresentar uma lipossolubilidade compatível (Kroll e Neuwelt, 1998; Pardridge, 2005). Essas são as propriedades essenciais, mas, além delas, o grau de ionização, a ligação a proteínas do plasma, o fluxo sanguíneo local e a afinidade por carreadores também podem influenciar na permeabilidade da BHE (Kemper *et al.*, 2004). Poucas moléculas apresentam essas características, e mesmo que as apresente, ainda assim a entrada ao sistema nervoso central não está garantida (Ghose *et al.*, 1999; Lipinski, 2000). Bombas de efluxo ativas, tal como a glicoproteína P, oferecem uma barreira protetora adicional ao sistema nervoso central, por agir lançando moléculas danosas de volta à corrente sanguínea (Juliano e Ling, 1976; Cordon-Cardo *et al.*, 1990). Em consequência, 98% das pequenas moléculas e todas as moléculas de alto peso molecular são excluídas do compartimento do sistema nervoso central (Pardridge, 2005). Assim, a BHE regula a homeostase cerebral por controlar a composição do CSF e o compartimento dos fluidos extracelulares, via entrada e retirada de compostos específicos da interface sangue-cérebro.

Além de ser responsável por tráfego reduzido de células do sistema imune para o sistema nervoso central (Engelhardt, 2006), a BHE também é importante para que ocorra a entrada de células inflamatórias, principalmente células T ativadas (Hickey *et al.*, 1991). No modelo de EAE, a invasão de células T através da BHE é considerada um dos acontecimentos que antecedem a manifestação da patologia autoimune (Smorodchenko *et al.*, 2007). Exemplos de alterações da BHE na EAE são mostrados no trabalho de Floris e colaboradores (2003), no qual ficou demonstrado aumento da permeabilidade da BHE em ratos Lewis pouco antes do surgimento de infiltrados de monócitos no sistema nervoso central; e no trabalho de Wuerfel e colaboradores (2007), no qual, utilizando ressonância magnética, foram detectadas alterações na BHE de camundongos antes das manifestações clínicas da EAE.

1.4.2. O plexo coróide

O plexo coróide é outra via possível de acesso das células T ao parênquima do sistema nervoso central. No entanto, as células endoteliais fenestradas do plexo coróide não apresentam as junções oclusivas que normalmente limitariam a diapedese de leucócitos na BHE. Tal fato sugere que o plexo coróide seja um local de acesso mais facilitado de linfócitos ao CSF (Wilson *et al.*, 2010). Em um trabalho recente, Reboldi e colaboradores (2009) relatam o papel de CCL20, liberado por células ependimárias do plexo coróide, no recrutamento de células T mediado por CCR6 (expresso nas células T). Além disso, sabe-se que as células ependimárias apresentam MHC classe I e classe II (Aldinger *et al.*, 1996; Nathanson e Chun, 1989).

1.5. Etiopatogênese da EAE

O recrutamento de leucócitos na EAE depende de uma gama de quimiocinas liberadas por diversas células do sistema nervoso central, do endotélio vascular e do sistema imune. Nesse contexto, as quimiocinas são mediadores críticos da migração celular que se ligam a receptores acoplados a proteína G (Allen *et al.*, 2007).

Kuchroo e colaboradores (2002) apresentaram uma proposta do mecanismo fisiopatológico que desencadearia a EAE. O papel de células T CD4⁺ autorreativas é fundamental neste processo. A maior parte destas células seria eliminada durante o desenvolvimento no timo, mesmo aquelas que expressam antígenos de mielina. No entanto, algumas células autorreativas escapariam da seleção tímica e constituiriam o repertório periférico de células T. Estas células seriam ativadas a partir do contato com o epítipo antigênico, contato este mediado por complexo de histocompatibilidade principal (MHC – major histocompatibility complex) em conjunto com sinais coestimulatórios apropriados. Após este evento, células T migrariam pela barreira hematoencefálica e, no sistema nervoso central, precisariam ser reativadas por células apresentadoras de antígeno locais, também expressando moléculas coestimulatórias, para que se inicie a inflamação e o dano ao tecido. Embora as células Th1 sejam necessárias para iniciar a doença, muitas das células vistas em lesões de EAE são recrutadas inespecificamente. Estas células infiltradas consistem principalmente de células T e macrófagos e, numa menor extensão, células B. Macrófagos ativados destroem mielina dos axônios e secretam inúmeras citocinas, incluindo IL-1 e TNF- α , o que perpetuaria reações inflamatórias não específicas e contribuiria para o dano tecidual. Assim, após

a saída do timo, células T autorreativas têm que passar por diversos pequenos estágios para mediar uma doença autoimune: elas devem ser ativadas no compartimento imune, diferenciar-se para assumir um fenótipo efetor patogênico, expressar moléculas de adesão apropriadas, migrar para o órgão efetor e ser reativadas para recrutar outras células que participarão do dano tecidual e do desenvolvimento da resposta autoimune.

Recentemente, descobriu-se uma nova linhagem de células que secretam elevadas quantidades de IL-17 e que não se enquadravam nos perfis Th1 e Th2, sendo denominadas Th17 (Infante-Duarte, 2000). Vários estudos apresentam evidências de que essas células têm papel fundamental nas doenças autoimunes, sendo encontrados níveis elevados de IL-17 em pacientes com esclerose múltipla (Lock *et al.*, 2002; Matusevicius *et al.*, 1999).

O papel da linhagem Th17 na EAE também se revelou fundamental, em conjunto com a linhagem Th1 (Korn *et al.*, 2007). A citocina produzida pelas células Th17, a IL17, é um indutor de MCP-1/CCL2 (Park *et al.*, 2005) que tem um papel importante no recrutamento de células mononucleares fagocíticas para o sistema nervoso central (Fife *et al.*, 2001). No curso natural de EAE induzida por MOG₃₅₋₅₅, o número de células Th17 no SNC tem um pico antes das células Th1 (Korn *et al.*, 2007). Estudos nos quais foi realizado o bloqueio da citocina IL-17A relataram diminuição dos sinais clínicos nos animais induzidos com EAE (Langrish *et al.*, 2005; Galicia *et al.*, 2009). Assim, células Th17 poderiam constituir a primeira onda de migração para o sistema nervoso central, controlando o recrutamento de ondas posteriores de células efectoras.

1.6. Fator Ativador Plaquetário

O Fator Ativador Plaquetário (PAF - 1-O-alkil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfolina) é um mediador lipídico que tem efeitos biológicos numa variedade de células e órgãos (Ishii e Shimizu, 2000). O termo “fator ativador plaquetário” foi cunhado devido à primeira função descrita para esta molécula, responsável pela agregação de plaquetas liberadas por basófilos de coelho após estimulação com IgE (Benveniste *et al.*, 1972). A caracterização da estrutura química do PAF foi realizada por Hanahan e colaboradores (1980) utilizando cromatografia gás-líquido e análise espectral de massa.

PAF é produzido por vários tipos de células, incluindo neutrófilos, eosinófilos, monócitos/macrófagos, e células do endotélio vascular (Montrucchio *et al.*, 2000). As atividades biológi-

cas do PAF são determinadas pela sua ligação ao receptor de PAF (PAFR), que pertence à super-família de receptores com sete domínios transmembrana acoplados a proteínas G.

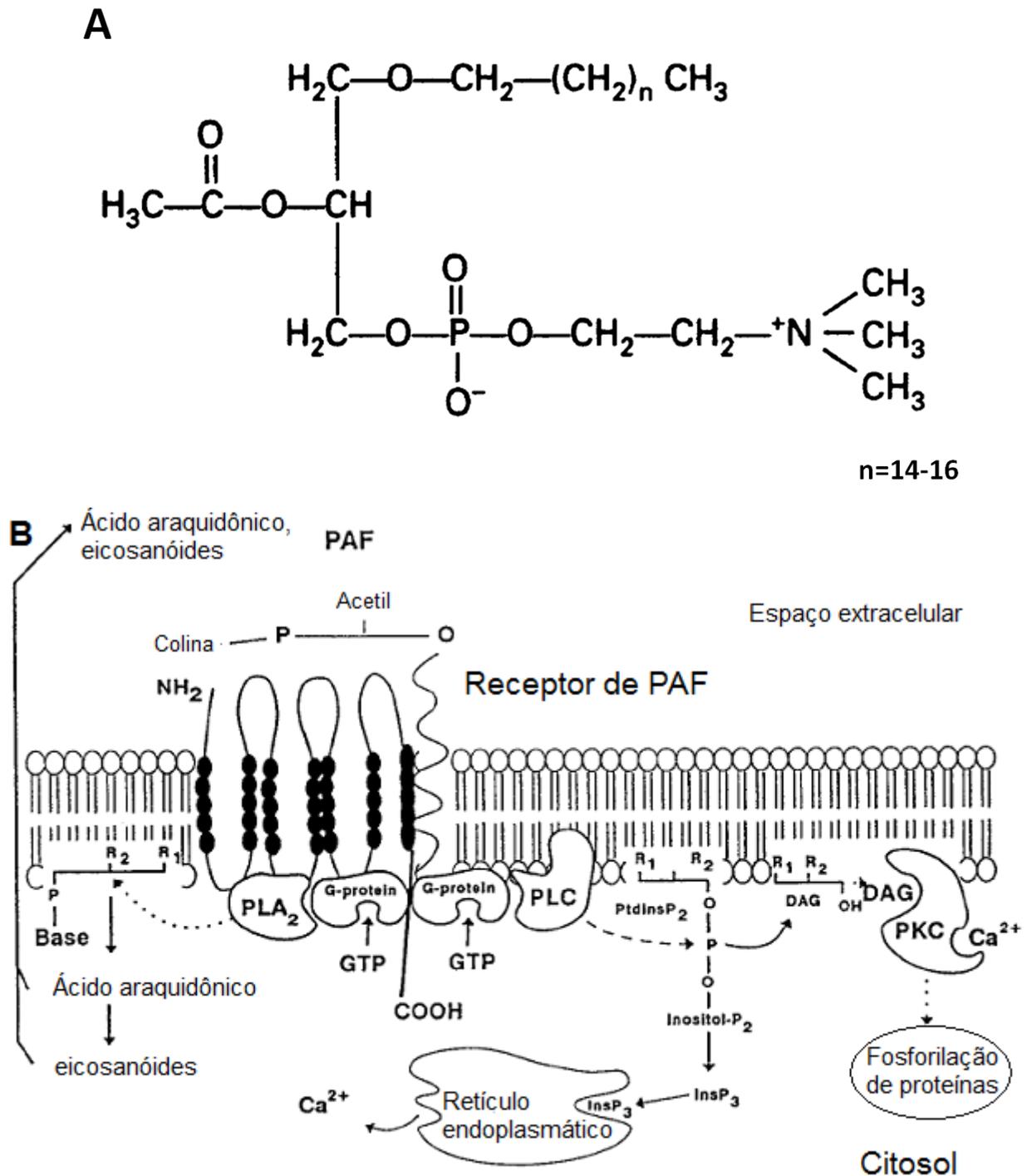


Figura 1.2 PAF e a sinalização pelo seu receptor. Estrutura molecular do Fator de Ativação Plaquetário (A) e representação esquemática das vias intracelulares ativadas a partir de seu receptor (B). Extraído de Chao e Olson (1993) e Montrucchio e colaboradores (2000) com modificações.

O receptor de PAF já foi encontrado em diversas células no organismo. Demonstrou-se que o receptor de PAF é sintetizado no cérebro, especificamente no hipocampo, onde ele é importante nas vias de sinalização de cálcio (Bito *et al.*, 1992). Também se encontrou uma expressão elevada do receptor de PAF na micróglia, na qual, sob estímulo do PAF, resultaria um aumento intracelular de Ca^{2+} (Mori *et al.*, 1996). PAF é capaz de induzir apoptose em oligodendrócitos e astrócitos em cultura (Hostettler *et al.*, 2002). Células do sistema imune também apresentam receptores de PAF, e sua ativação leva a efeitos específicos. Por exemplo, o PAF é capaz de ativar neutrófilos (Welch *et al.*, 2009).

O PAF está envolvido em diversas condições fisiopatológicas, como asma alérgica, choque endotóxico, pancreatite aguda e inflamações dérmicas como psoríase e prurite (Ishii e Shimizu, 2000). Algumas linhas de evidência sugerem que o PAF pode também ter um papel nas doenças consideradas autoimunes, como esclerose múltipla, e em seu modelo experimental, a EAE (Pedotti *et al.*, 2003; Callea *et al.*, 1999; Lock *et al.*, 2002). Em um estudo, os níveis de PAF estavam elevados no líquido e no plasma de pacientes que apresentavam a forma surto-remissão de esclerose múltipla (Callea *et al.*, 1999). Além disso, níveis aumentados de transcritos de PAFR foram identificados, em análise genética por *microarray*, em lesões de esclerose múltipla em humanos (Lock *et al.*, 2002). Transcritos de PAFR também estavam aumentados no cérebro e na medula espinhal de camundongos SJL com EAE (Pedotti *et al.*, 2003). Um polimorfismo específico para o gene do receptor de PAF estava aumentado em pacientes japoneses com esclerose múltipla (Osoegawa *et al.*, 2005). Embora esses estudos sugiram que o PAF possa contribuir para a fisiopatologia de esclerose múltipla/EAE através do PAFR, desconhece-se como isso ocorre.

Animais deficientes para o receptor de PAF foram desenvolvidos. Esses animais foram criados por inativação do gene para receptor de PAF em células tronco embrionárias de E14-1 obtidos de animais 129/Ola (Ishii *et al.*, 1998). O perfil genético dos camundongos é predominantemente uma mistura aleatória de alelos 12/Ola e C57BL/6. A inativação do gene para o receptor de PAF foi confirmada por análise genômica por Southern blot e por análise de RNA isolado de neutrófilos por Northern blot. Macrófagos peritoneais e tecido pulmonar desses camundongos não apresentavam sítios de ligação para WEB 2086, o que confirmou a perda de receptores de superfície nesses tecidos. Nenhuma anormalidade morfológica significativa foi detectada nesses animais (Ishii & Shimizu, 2000).

1.7. Ansiedade

Barlow *et al.* (1996) definem ansiedade como um senso de descontrole focado principalmente em possíveis ameaças ou potenciais eventos negativos futuros. Assim, a ansiedade pode ser caracterizada como um estado de desamparo devido a uma inabilidade de prever, controlar ou obter resultados desejados em certos contextos ou situações futuras. Acompanhando esse estado afetivo negativo, ocorre um componente fisiológico significativo que pode refletir ativação de circuitos cerebrais distintos.

A ocorrência de ansiedade em animais é postulada devido à percepção de que circuitos ativados em humanos também são ativados em animais em situações que geram um fenótipo semelhante ao comportamento ansioso. Um exemplo é a exposição de um roedor a um ambiente com uma região aberta (sem nenhum tipo de abrigo ou paredes) e com uma região fechada. Naturalmente, o animal tende a frequentar mais o ambiente fechado, mas também não deixa de explorar o ambiente aberto, que pode apresentar perigos, mas também oportunidades, como alimentos. O labirinto em cruz elevado é um método utilizado para o estudo de ansiedade em roedores, e é baseado na aversão de camundongos a um ambiente aberto (Lau *et al.*, 2008).

A amígdala é a principal estrutura neuroanatômica implicada na ansiedade. Suas projeções com diversas estruturas do sistema nervoso, como o hipotálamo lateral, o nervo vago, o núcleo parabraquial, a área tegmental ventral, o lócus ceruleus, para citar alguns, resultam nos eventos fisiológicos que caracterizam a ansiedade (Davis, 1992).

Fenômenos inflamatórios, mesmo sendo periféricos, podem gerar comportamento semelhante à ansiedade em roedores (Benatti *et al.*, 2011). Como eventos neuroinflamatórios provocam alterações comportamentais importantes em humanos, também é relevante analisar possíveis mudanças em padrões de ansiedade nos modelos animais.

1.8. Memória

Memória pode ser definida como a habilidade em um organismo de armazenar, reter e evocar informação e experiências. Memória pode ser dividida em dois tipos principais: memória implícita e explícita. A memória explícita pode ser subdividida em memória semântica e episódica, sendo esta última a memória de eventos autobiográficos, que possam ser explicitamente citados (Tulving, 1984).

Em animais, existem diversos testes em que se propõe medir memória episódica, baseando-se em parâmetros como o tempo gasto pelo animal na exploração de algo ou a reação do animal a um contexto previamente exposto.

Independente do tipo, a aquisição e processamento de memória estão associados a estruturas cerebrais, entre as quais é possível citar o hipocampo, a amígdala, o estriado e os corpos mamilares. Como essas estruturas são encontradas tanto em humanos quanto em roedores, é possível utilizar os últimos no estudo dos mecanismos envolvidos na memória.

Yirmiya e Goshen (2011) descrevem, em uma extensa revisão sobre memória e sistema imune, como moléculas tradicionalmente conhecidas como agentes do sistema imune podem ser benéficas e deletérias à formação e ao processamento de memória. Sabe-se que animais que não apresentam células T CD4⁺ tem problemas na aquisição de memória, que são resolvidos quando os animais recebem essas células. É também notável que a citocina IL-1 β é induzida durante a consolidação de memória, e sua ausência resulta em menor aquisição desta, muito embora níveis muito altos de IL-1 β sejam nocivos para a formação de memória. Outras citocinas, como IL-6 e TNF- α , quando elevadas, pioram a aquisição de memória.

Em doenças neuroinflamatórias, como na EM, e no seu modelo, EAE, há intensa liberação de citocinas e ativação de células do sistema imune. Paralelamente, ocorre quebra da barreira hematoencefálica, permitindo a interação de todos aqueles componentes do sistema imune com estruturas cerebrais e, assim, é possível que ocorra interferência na formação de memória.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral:

Investigar o efeito da ausência funcional do fator ativador plaquetário em camundongos submetidos à EAE.

2.2. Objetivos específicos:

Estudar a resposta clínica de camundongos selvagens e deficientes para o gene do receptor de PAF (PAFR) submetidos à EAE;

Investigar a dinâmica de rolamento e adesão de leucócitos na circulação cerebral de camundongos selvagens e deficientes para o gene PAFR submetidos à EAE;

Avaliar as concentrações de mediadores inflamatórios no sistema nervoso central de camundongos selvagens e deficientes para o gene PAFR submetidos à EAE;

Investigar a resposta do tipo Th17 no curso clínico de camundongos deficientes para o gene PAFR submetidos à EAE;

Analisar alterações histopatológicas na medula espinhal e no cérebro de camundongos submetidos à EAE;

Avaliar parâmetros de ansiedade nos animais durante o desenvolvimento e após a fase de remissão da EAE;

Analisar parâmetros de memória nos animais durante o desenvolvimento e após a fase de remissão da EAE;

Investigar a síndrome comportamental associada à EAE.

3. Materiais e métodos

3.1. Animais

Camundongos fêmeas C57BL/6 foram obtidos do biotério da Universidade Federal de Minas Gerais, entre 9 e 10 semanas de idade. Camundongos fêmeas entre 9 e 10 semanas deficientes para o gene PAFR foram gentilmente cedidos pelo professor Takao Shimizu (Universidade de Tóquio) e foram mantidos e reproduzidos em condições livres de patógenos no Instituto de Ciências Biológicas. Este trabalho foi autorizado pelo CETEA através do protocolo 129/2006.

3.2. Reagentes e indução do EAE

O peptídeo MOG (MOG₃₅₋₅₅), de seqüência 35-55 (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK; Auspep) e adjuvante completo de Freund (CFA) foram comprados da NeoMPS. EAE será induzido por imunização subcutânea (base da cauda) com uma emulsão contendo 100µg do antígeno peptídeo MOG₃₅₋₅₅ e CFA suplementado com 4mg/mL de H37 RA de *Mycobacterium tuberculosis* obtido de Laboratórios Difco. Foi injetada toxina pertussis (obtida da SIGMA) numa dose de 300ng por animal injetada intraperitonealmente no dia da imunização e 48h depois. Os animais foram pesados imediatamente antes do início do tratamento e diariamente após a imunização. O estado clínico dos animais também foi monitorado diariamente utilizando-se três escalas clínicas padronizadas.

3.2.1. Escala clínico 1

A seguinte escala de valores clínicos é a mais simples e uma das mais utilizadas em trabalhos com EAE. Está organizada da seguinte maneira:

- 0 Nenhum sinal clínico.
- 1 Paralisia de cauda (ou perda de tônus da cauda)
- 2 Paralisia de cauda e fraqueza de membros posteriores
- 3 Paralisia de membros posteriores
- 4 Paralisia completa de membros posteriores e fraqueza de membros anteriores

3.2.2. *Escore clínico 2*

Extraído de Guan e colaboradores (2006), esta escala é baseada no Escore clínico 1, no entanto, há maior detalhamento da debilidade motora, pois também é levada em consideração a marcha do animal e possíveis fraquezas de cauda.

- 0 Nenhum sinal clínico;
- 0,5 Paralisia parcial de cauda;
- 1 Paralisia de cauda ou marcha alterada;
- 1,5 Paralisia parcial de cauda e marcha alterada;
- 2 Paralisia de cauda e marcha alterada;
- 2,5 Paralisia parcial de membros inferiores;
- 3 Paralisia de um dos membros inferiores;
- 3,5 Paralisia de um dos membros inferiores e paralisia parcial do outro membro inferior;
- 4 Paralisia de dois membros inferiores;
- 4,5 Moribundo.

3.2.3. *Escore clínico 3*

Esta escala utilizada por Weaver e colaboradores (2005), é pouco utilizada em trabalhos envolvendo EAE. No entanto, optou-se por usá-la devido à riqueza de detalhamento na descrição motora do animal doente. Nela, existem vários testes relativos à cauda, membros inferiores, membros superiores e função da bexiga. O escore do animal é a soma dos escores obtidos na avaliação de cada uma das funções motoras.

Cauda

- 0 Um camundongo normal mantém sua cauda ereta enquanto se move.
- 1 Se a extremidade da cauda está flácida, com tendência a cair.
- 2 Se a cauda está completamente flácida e arrasta na superfície.

Patras traseiras

- 0 Um camundongo normal tem uma marcha enérgica e não arrasta suas patas.
- 1 Um dos dois testes seguintes é positivo:
 - a) Enquanto mantém a cauda entre o polegar e o indicador, virar o animal de barriga para cima. Um camundongo saudável se vira imediatamente. Uma demora sugere fraqueza nas patas traseiras;
 - b) Posicionar o camundongo na parte externa da gaiola. Se, ao se mover sobre a grade, uma ou ambas as patas traseiras freqüentemente atravessam as barras da gaiola, considera-se que há uma paralisia parcial.
- 2 Ambos os testes anteriores são positivos.
- 3 Uma ou ambas as patas traseiras mostram sinais de paralisia, mas algum movimento é preservado.
- 4 Ambas as patas traseiras paralisadas e o camundongo as arrasta enquanto se move.

Patras dianteiras

- 0 Camundongo normal usa as patas dianteiras ativamente para se agarrar e andar e mantém sua cabeça ereta.
- 1 Andar é possível, mas difícil, devido à fraqueza em uma ou ambas as patas; por exemplo, o camundongo tem dificuldade em se agarrar na parte interior da gaiola. Outro sinal de fraqueza é falta de tônus no pescoço.
- 2 Quando uma pata dianteira está paralisada e o camundongo fica dando voltas em torno da pata paralisada. O pescoço também perde muito de seu tônus muscular.
- 3 O camundongo não pode se mover e não consegue beber água ou se alimentar.

Bexiga

- 0 Um camundongo normal tem total controle sobre sua bexiga.
- 1 Camundongo incontinente, quando a porção inferior do corpo está molhada de urina.

3.3. Testes comportamentais

3.3.1. Labirinto em Cruz Elevado (*Elevated Plus Maze*)

Constitui um dos principais testes para avaliação da ansiedade em camundongos, sendo um método válido de investigação comportamental (File, 2001; Carola *et al.*, 2002). Baseia-se no conflito entre o desejo de explorar novos ambientes e o medo de áreas abertas e desconhecidas, além da associação de elementos ansiogênicos tais como elevação e iluminação (Lau *et al.*, 2008).

O labirinto em Cruz Elevado (Insight®, SP, Brasil) possui dois braços abertos e dois fechados, que emergem de uma plataforma central e estão dispostos em direções opostas formando uma cruz. A plataforma apresenta uma elevação da base (38,5 cm) e o aparato é iluminado por lâmpadas nos quatro braços e pela claridade do ambiente onde será aplicado o teste.

Cada camundongo foi colocado na plataforma central do labirinto com a cabeça direcionada para o braço aberto. Permitiu-se ao animal percorrer livremente o labirinto durante cinco minutos (Carola *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2006). O avaliador registrou a frequência com que o camundongo entrava com as quatro patas nos braços aberto e fechado e o tempo total em que permanecia em ambos os braços. A medida da ansiedade foi a porcentagem de entradas e de tempo gasto nos braços abertos, sendo que baixas porcentagens indicam maiores níveis de ansiedade (File, 2001; Podhorna e Brown, 2002; Zhu *et al.*, 2006). Assim, os valores de exploração foram calculados da seguinte maneira:

$$\text{Porcentagem de exploração} = \frac{\text{Tempo de exploração do braço aberto}}{\text{Tempo de exploração do braço fechado} + \text{braço aberto}} \times 100$$

3.3.2. Teste de Memória de Reconhecimento de Objetos (*Object Recognition Memory*)

O teste de Memória de Reconhecimento de Objetos é utilizado em modelos experimentais com roedores na avaliação de aspectos cognitivos, como a memória de curto e longo prazo. É baseado na tendência natural dos animais em explorar preferencialmente objetos desconhecidos (Desruisseaux *et al.*, 2008).

O teste foi realizado em um campo aberto de 40 x 60 cm delimitado por 4 paredes com 50 cm de altura, sendo 3 de acrílico branco e uma de acrílico transparente. O piso do campo aberto é dividido em 12 quadrados iguais demarcados por linhas transparentes. No primeiro dia foi realizada a habituação, no qual o animal cuidadosamente colocado no quadrado do canto posterior esquerdo do aparelho explorar o ambiente por 5 minutos. No segundo dia o animal foi recolocado no aparelho, no qual estavam dois objetos iguais em forma, tamanho e cor (A e B). O animal novamente explorou o ambiente por 5 minutos e o tempo gasto na exploração de cada objeto foi registrado. No mesmo dia, 1 hora e 30 minutos depois do primeiro teste, foi avaliada a memória de curta duração. O animal explorou novamente o ambiente na presença do objeto familiar (A) e de um novo objeto (C), diferente em forma, tamanho e cor. Registrou-se novamente o tempo total que o animal explorou cada objeto. No dia seguinte (24 horas após) foi avaliada a memória de longa duração. O mesmo procedimento foi realizado, o objeto C foi substituído pelo objeto D (diferente do objeto A). O tempo de exploração de cada objeto foi novamente registrado. A seguir, foi realizado o seguinte cálculo:

$$\text{Porcentagem de exploração} = \frac{\text{Tempo explorando objeto 1}}{\text{Tempo explorando objeto 1} + \text{Tempo explorando objeto 2}} \times 100$$

Uma porcentagem maior de tempo gasto na exploração do objeto novo indica normalidade da função cognitiva. Foi considerada exploração do objeto pelo animal qualquer contato físico (tocar o objeto com o nariz ou patas) ou orientação óbvia para o objeto a uma distância de 3 cm (Tuon *et al.*, 2008).

3.4. Microscopia intravital no cérebro do camundongo

Microscopia intravital na microvasculatura cerebral do camundongo foi executada como descrita anteriormente por Carvalho-Tavares e colaboradores (2000). Resumidamente, os camundongos foram anestesiados por uma injeção intraperitoneal de uma mistura de 150mg/kg de ketamina e 10mg/kg de xylazina e a veia da cauda foi canulada para a administração de corantes fluorescentes. A craniotomia foi executada usando uma broca de alta velocidade (Dremel, EUA) e a dura-máter foi removida para expor a vasculatura da pia-máter. Durante o experimento, o ca-

mundongo foi mantido a 37°C com um aquecedor (Fine Science Tools Inc., Canadá) e o cérebro exposto foi continuamente superfundido com líquido tamponado, cuja composição é a seguinte, em mmol/L: NaCl 132; KCl 2,95; CaCl₂ 1,71; MgCl₂ 0,64; NaHCO₃ 24,6; dextrose 3,71 e uréia 6,7, pH 7,4 a 37°C. Para observar as interações entre o endotélio e os leucócitos, os leucócitos foram fluorescentemente marcados por administração intravenosa de rodamina 6G (0,5mg/kg de peso corporal) e um microscópio (Olympus BX40), com objetiva 10X, foi utilizado para observar os eventos microcirculatórios nos vasos cerebrais. A fluorescência associada a rodamina 6G foi visualizada com epi-iluminação a 510-560nm, usando um filtro de emissão de 590nm. Uma câmera de vídeo (Optronics) projetava as imagens que foram gravadas em vídeo-cassete (VHS, Semp Toshiba, modelo x685) para uma posterior análise. O número de leucócitos em rolamento e adesão foi determinado através da análise posterior dos vídeos. Cada gravação foi de três minutos, o primeiro e o último minutos foram descartados e a contagem foi realizada no minuto restante. O rolamento de leucócitos foi definido como células movendo a uma velocidade menor que o fluxo sanguíneo. Leucócitos foram considerados aderidos ao endotélio se permaneciam estacionários por um período de 1min. O rolamento e a adesão leucocitária foram expressos como número de células por minuto. A análise foi realizada em três vasos de cada animal e a média simples da contagem dos três vasos foi utilizada para os cálculos estatísticos.

3.5. Medida dos níveis de citocinas e quimiocinas no soro e cérebro por ELISA

3.5.1. Preparo de homogenato de cérebro de camundongo

Os cérebros de animais controle e de animais infectados foram retirados, devidamente acondicionados e, quando necessário, estocados a -20°C. As amostras foram posteriormente pesadas (100 mg) e colocadas em 1 mL de solução inibidora de proteases adequada para extração de citocinas [NaCl 0,4 M; Tween 20 0,05%; Albumina de soro bovino (BSA) 0,5%; Fluoreto de fenilmetilsufonila (PMSF) 0,1mM; cloreto de benzetônio 0,1 mM; EDTA 10 mM; 20 KI de aprotinina], preparada a partir de uma solução de tampão fosfato (NaCl 8g, KCl 0,2g e Na₂HPO₄.12H₂O 2,89g diluídos em 1 litro). As amostras foram processadas em um homogenizador de tecidos (Ultra-Turrax) e o homogenato foi centrifugado a 10000 r.p.m./10 min, a 40°C. O sobrenadante foi recolhido, aliqotado e estocado a -20°C até o uso (Dos Santos *et al.*, 2005).

3.5.2. Determinação de citocinas por ELISA

Os kits para ELISA para dosagem das citocinas TNF- α e IFN- γ e das quimiocinas murinas Kc/CXCL1, MIG/CXCL9, MIP-1 α /CCL3, MCP-1/CCL2 e RANTES/CCL5 foram obtidos da R&D Systems (DuoSet) e utilizados de acordo com os procedimentos previamente descritos pelo fabricante. As concentrações das citocinas TNF- α e IFN- γ e das quimiocinas MCP-1/CCL2, Kc/CXCL1, RANTES/CCL5, MIG/CXCL9 e MIP-1 α /CCL3 foram avaliadas no sobrenadante de homogenato de cérebro em diluição 1:3 em PBS contendo 0,1% de soro albumina bovina (BSA). Adicionalmente, a concentração sistêmica de TNF- α foi avaliada no soro dos animais em um protocolo semelhante (diluição 1:3 em PBS/BSA 0,1%).

Em placas de 96 poços (Nunc. Immunosorb, Naperville), foram adicionados 100 μ L/poço do anticorpo de captura, sendo este específico para cada molécula e em concentração adequada. Esta solução permaneceu em contato com a placa durante 18h a 4°C e foi, posteriormente, lavada cinco vezes com PBS/Tween 0,1%, utilizando um lavador de placas automático (ELX50, Bio-Tet Instruments, INC). Logo após, foram adicionados 200 μ L/poço de solução de bloqueio (PBS/BSA 1%). O tempo de bloqueio foi de duas horas sob agitação. Transcorrido este tempo, houve nova lavagem das placas e 100 μ L de cada amostra foram adicionados à placa.

Paralelamente, para o estabelecimento de cada curva padrão, foram utilizadas diferentes diluições das quimiocinas, a partir das seguintes concentrações iniciais: TNF- α , 2000pg/mL; IFN- γ , 2000pg/mL; Kc/CXCL1, 1000pg/mL; MCP-1/CCL2, 500pg/mL; RANTES/CCL5, 2000pg/mL; MIG/CXCL9, 1000pg/mL; MIP-1 α /CCL3, 1000pg/mL. As placas foram incubadas por mais 18h a 4°C. As placas foram lavadas e foram adicionados 100 μ L/poço de solução de anticorpo de detecção, biotilado e específico para cada molécula. As placas foram incubadas por uma hora e foram lavadas em seguida. Transcorrida esta etapa, foram adicionadas a cada placa uma solução contendo estreptavidina ligada à peroxidase (HRP, Pharmingen). Após 30 minutos, a placa foi novamente lavada, a continuação foi adicionado o tampão substrato contendo o-fenilenodiamina (OPD, Sigma) e H₂O₂ (Merck). Após cerca de 30 minutos, a reação foi interrompida com 50 μ L de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1M. O produto da oxidação do OPD foi detectado por colorimetria em leitor de placas a 492nm (Molecular Devices, USA). A concentração referente a cada amostra foi calculada a partir da curva padrão correspondente.

3.6. Análise por citometria de fluxo

Após o sacrifício, o cérebro dos animais foi retirado e os leucócitos foram extraídos do tecido por homogeneização através de um macerador em meio RPMI. Esta suspensão de célula foi fracionada usando um gradiente consistindo de 30% de percoll (Sigma, St. Louis, MO) diluído em RPMI sobre uma camada de 75% de percol diluído em RPMI. Após centrifugação (1100×g), a mielina foi aspirada do topo da camada de percol 30%. Os leucócitos foram removidos entre as camadas de 75% e 30% de percoll, novamente centrifugados em 600×g e ressuspensos em 1mL de solução contendo 0.5% de soroalbumina bovina, 2mM de azida e solução salina tamponada. Os leucócitos obtidos do sistema nervoso central foram marcados com uma combinação de anticorpos de isotiocianato de fluoresceína (FITC) e ficoeritrina (PE) direcionados contra a molécula de superfície CD4 e a molécula intracelular IL-17. Os dados foram adquiridos utilizando um FACScan (Becton Dickinson, San José, CA, EUA) e os dados foram processados utilizando o software Cell Quest (Becton Dickinson, San José, CA, EUA). Os dados coletados foram analisados utilizando o software FlowJo (Tree Star, Ashland, Oregon, EUA).

3.7. Histologia

Os animais receberam uma dose letal do anestésico e, após estarem completamente anestesiados, foram perfundidos intracardialmente por uma solução de formalina 10%. Durante a necrópsia, o tecido cerebral foi cuidadosamente dissecado e dividido em corte longitudinal, separando em dois hemisférios que foram utilizados na histologia. A coloração de rotina Hematoxilina-Eosina (HE) foi realizada para uma observação geral das alterações histopatológicas.

Durante a necropsia, o tecido nervoso foi coletado e fixado em solução de formalina 10% tamponada, pH 7.2, com o objetivo de preservar a morfologia e a composição do material. As amostras foram mantidas em formol durante 48 horas, período necessário para fixação.

O tecido nervoso foi submetido à desidratação em concentrações crescentes de álcool (70%, 80%, 90% e absoluto) sendo que os fragmentos permaneceram imersos por um período de 30 minutos em cada álcool. Após a etapa de desidratação, foi realizado o processo de diafanização, que tem como objetivo tornar o tecido translúcido. A diafanização consistiu em submeter os

fragmentos a dois banhos de xilol com duração de 20 minutos cada. Posteriormente, os tecidos foram impregnados e incluídos em paraplast.

Os blocos contendo os fragmentos de tecido nervoso foram submetidos à microtomia, sendo seccionados transversalmente, com 4 μ m de espessura. Dois cortes seriados de cada amostra foram utilizados para as distintas colorações. Os cortes foram colocados em banho-maria para que as fitas fossem esticadas e coletadas por lâmina, que foram colocadas posteriormente na estufa para secarem em temperatura de 60°C.

O processo de coloração se iniciou com a imersão das lâminas em xilol durante 20 minutos para desparafinização. Em seguida, estas lâminas foram imersas em banhos de álcool absoluto, álcool 95%, álcool 80%, álcool 70%, e água para hidratação. Após a hidratação, as lâminas foram imersas no corante específico, seguindo as exigências de cada técnica.

A coloração de rotina Hematoxilina-Eosina (HE) foi realizada para uma observação geral das alterações histopatológicas. As lâminas foram imersas em Hematoxilina (corante ácido) por dois minutos, em seguida lavadas em água corrente por três minutos. Finalizada esta etapa, as lâminas foram imersas no corante Eosina (corante básico), por dez segundos, e em seguida lavadas em água corrente por três minutos. Logo após, as lâminas foram desidratadas, sendo imersas na bateria de álcool 70%, álcool 80%, álcool 95% e álcool absoluto (I, II, III) e xilol (I, II, III). Posteriormente, as lâminas foram montadas com Entellan (Merck) e lamínula, levadas à estufa a 60°C por alguns minutos para secagem.

3.8. Técnica para dosagem de atividade de N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG) no tecido cerebral

A N-acetil- β -D-glicosaminidase é uma enzima lisossômica produzida por macrófagos ativados. Esta técnica é utilizada para quantificar a infiltração destas células nos sítios inflamatórios (Bayley, 1988). A atividade de NAG baseia-se na hidrólise do substrato p -nitrofenil-N-acetil- β -D-glicosamina pela enzima N-acetil- β -D-glicosaminidase, liberando p -nitrofenol.

Para a realização do ensaio, fragmentos de tecido cerebral foram pesados e ressuspensos, na proporção de 1.9 mL de solução para cada 100mg de tecido, em solução salina 0,9% (4°C) contendo 0,1% v/v de Triton X-100 (Merck). Logo em seguida, as amostras foram submetidas a homogeneização por 30 segundos e, em seguida, centrifugada a 4°C por 10 minutos a

10.000rpm (1.500×g). Os sobrenadantes foram imediatamente recolhidos e utilizados para o ensaio.

A reação foi iniciada após a adição de 100µL de p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosaminidase (Sigma-Aldrich), diluída em tampão citrato/fosfato (pH 4.5) na concentração final de 2,24 mM, a 100µL do sobrenadante recolhido. A reação se processou a 37°C por 10min, em placas de 96 poços (NUNC). O término da reação foi dado pela adição de 100µL de tampão glicina 0.2M (pH 10,6) e posterior leitura da absorbância das amostras a 405nm em espectrofotômetro (Spectra Max 190, Molecular Devices). O conteúdo de macrófagos foi calculado a partir de uma curva padrão da atividade de NAG. Os resultados foram expressos em densidade óptica (OD) por g de tecido.

3.9. Análise estatística

Os dados foram apresentados com média±SEM. Os testes t-student e ANOVA, com correção Bonferroni, foram utilizados para comparações múltiplas. A significância estatística foi $P<0,05$.

4. Resultados

4.1. Resultados utilizados na publicação do artigo intitulado “Absence of PAF receptor alters cellular infiltrate but not rolling and adhesion of leukocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis”

4.1.1. Animais deficientes para o receptor de PAF desenvolvem EAE menos grave

Induziu-se EAE em um grupo de camundongos fêmeas selvagens (WT) e deficientes para o gene do receptor de PAF (PAFR^{-/-}) e avaliaram-se diariamente a massa e a manifestação clínica destes animais. Os animais WT desenvolveram sinais clínicos como paresia e paralisia de membros posteriores, como pode ser demonstrado no Gráfico 1. Todos os animais WT desenvolveram sinais clínicos. Em contraste, os animais PAFR^{-/-} tiveram sinais clínicos significativamente mais brandos que os selvagens, comparando-se os escores clínicos (p=0.01). Além disso, 2 animais de um total de 7 (cerca de 28%) não apresentaram qualquer sinal clínico e, como pode ser observado no Gráfico 1, os animais recuperaram a maior parte dos movimentos após 19 dias de indução (fase de remissão).

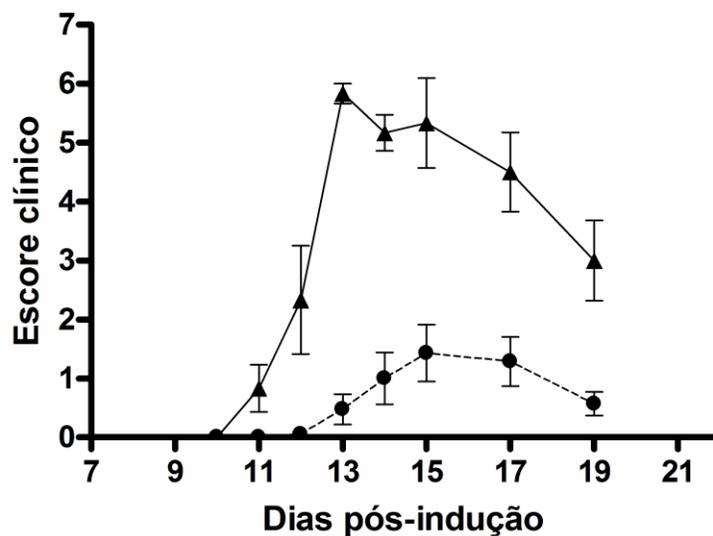


Gráfico 1 Desenvolvimento de sinais motores após indução de EAE em animais WT e PAFR^{-/-}. Animais WT EAE (▲) e PAFR^{-/-} EAE (●) foram induzidos com EAE e a debilidade motora foi monitorada diariamente utilizando o escore clínico segundo Weaver *et al.* (2005). Animais PAFR^{-/-} (n=7) apresentaram escore clínico significativamente menor que os animais WT (n=6) ao longo de 19 dias de EAE (p=0.01).

A evolução da massa corporal dos animais seguiu uma cinética semelhante à do escore clínico. Assim, os animais WT apresentaram perda significativa de massa a partir do décimo dia de imunização, ao passo que os animais deficientes para o receptor de PAF não apresentaram qualquer perda de peso significativa, como mostrado no Gráfico 2.

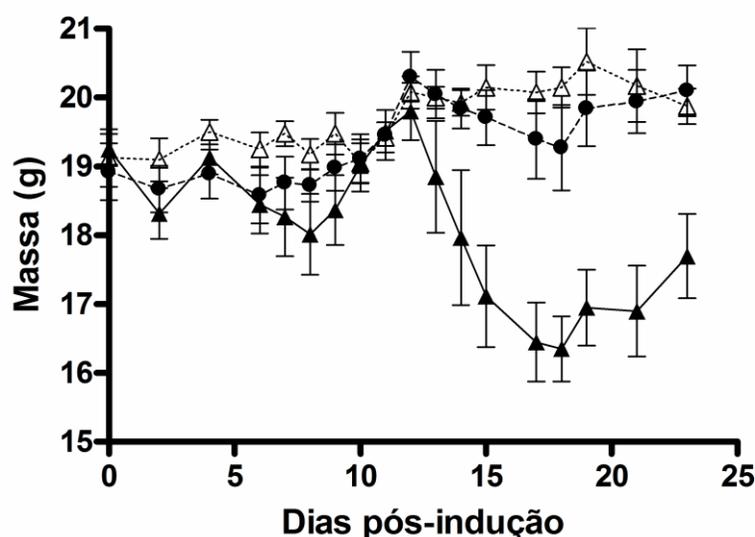


Gráfico 2 Perda de massa em animais após indução de EAE. Animais controles sem EAE (Δ), WT EAE (\blacktriangle) e PAFR^{-/-} EAE (\bullet) foram monitorados diariamente até 24 dias após a indução de EAE. Animais WT EAE tiveram perda significativa de massa ($p < 0.001$), enquanto animais PAFR^{-/-} EAE não apresentaram perda de massa. Animais PAFR^{-/-} não induzidos com EAE tiveram comportamento similar aos animais WT controles e foram omitidos do gráfico para facilitar visualização.

Assim, em resumo, a ausência do receptor de PAF altera o curso clínico na encefalomielite autoimune experimental.

4.1.2. Animais PAFR^{-/-} apresentam distintos infiltrados inflamatórios no sistema nervoso central após indução de EAE

Após a constatação de menor gravidade clínica nos animais PAFR^{-/-}, procurou-se investigar as causas desse resultado. Foram coletadas medulas espinhais de animais WT e PAFR^{-/-} após 14 dias de imunização, ou seja, no momento de maior gravidade da EAE. As medulas foram fixadas em formalina tamponada e realizou-se análise histopatológica de rotina por HE.

Como esperado, animais WT apresentaram intenso infiltrado inflamatório perivascular quando comparados a animais controles não induzidos com EAE, como pode ser verificado na Figura 2. Nos animais PAFR^{-/-} foi verificado infiltrado celular na medula em quantidade aparentemente menor (Figura 3), porém, e surpreendentemente, este infiltrado apresentou um padrão celular distinto. Enquanto os animais WT apresentaram células mononucleares (Figura 4), os

camundongos PAFR^{-/-} apresentaram células polimorfonucleares (Figura 5), principalmente neutrófilos e eosinófilos.

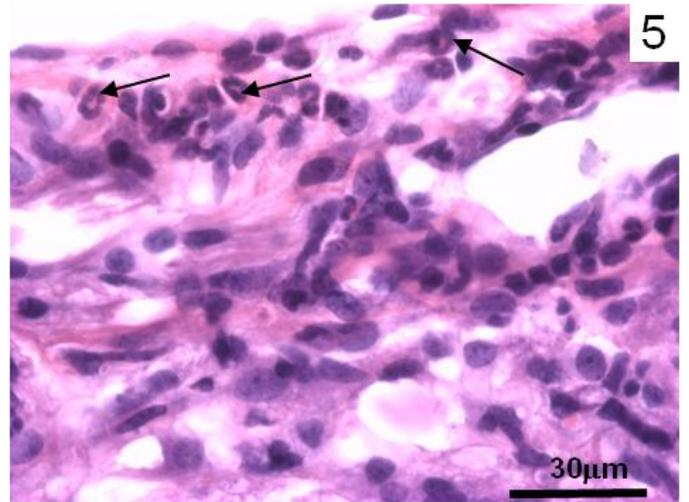
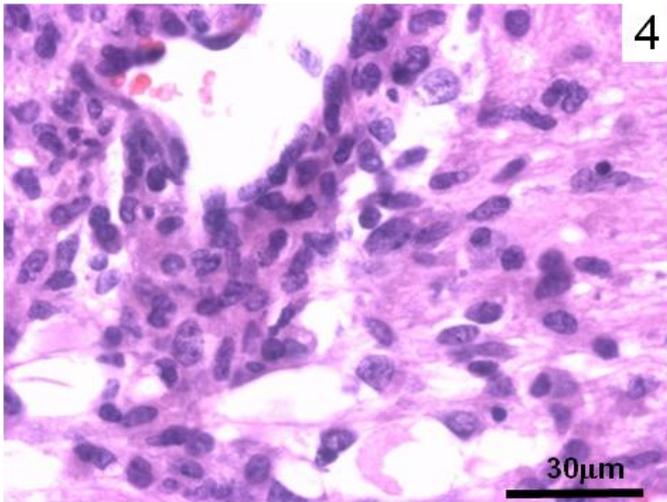
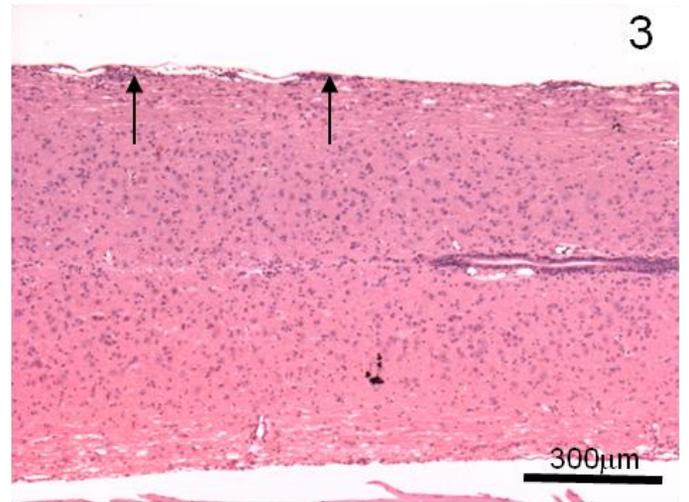
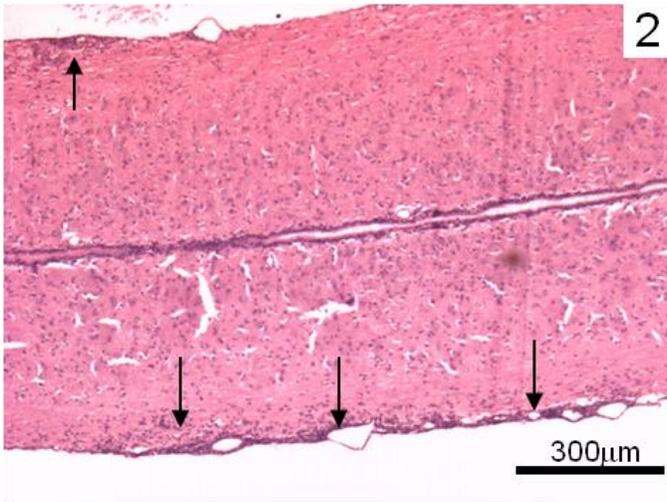
Assim, animais PAFR^{-/-} também apresentam infiltrado inflamatório após 14 dias de EAE, porém o infiltrado é composto predominantemente por células polimorfonucleares.

Figura 2 Aspecto histológico panorâmico das medulas de animais WT induzidos com EAE. Observa-se intenso infiltrado de células próximo à meninge (seta) após 14 dias da indução de EAE. Aumento: 40X.

Figura 3 Aspecto histológico panorâmico das medulas de animais PAFR^{-/-} induzidos com EAE. Observa-se intenso infiltrado de células próximo à meninge (seta) após 14 dias da indução de EAE, em quantidade similar aos animais WT. Aumento: 40X.

Figura 4 Medula espinhal corada com H&E de animais WT com EAE. Após 14 dias de indução, os animais WT apresentam infiltrados inflamatórios marcantes, principalmente de células mononucleares, tanto no parênquima quanto em regiões perivasculares. 400X.

Figura 5 Medula espinhal corada com H&E de animais PAFR^{-/-} com EAE. Após 14 dias de indução, os animais PAFR^{-/-} apresentam infiltrados inflamatórios em quantidade semelhante aos WT. No entanto, as células infiltrantes são predominantemente polimorfonucleares, como neutrófilos e eosinófilos 400X.



4.1.3. Não há aumento de macrófagos em animais PAFR^{-/-} na fase aguda da EAE

No intuito de se quantificar os macrófagos presentes no tecido nervoso, foi realizado o ensaio de N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG) no tronco encefálico dos animais. Animais WT induzidos com EAE (n=5; OD±EM; 3.27±0.26) tiveram aumento significativo (p<0.05) da densidade óptica em relação aos animais controles (n=4; 2.60± 0.07), como pode ser verificado no Gráfico 3. A densidade óptica nos animais PAFR^{-/-} induzidos com EAE (n=7; 2.26±0.13) foi significativamente menor que nos animais WT (p<0.001), evidenciando ainda mais a menor atividade macrofágica e, por conseguinte, o menor número de infiltrados mononucleares no sistema nervoso central. Não houve diferença entre os animais PAFR^{-/-} controles (2.15± 0.17) e os PAFR^{-/-} induzidos com EAE.

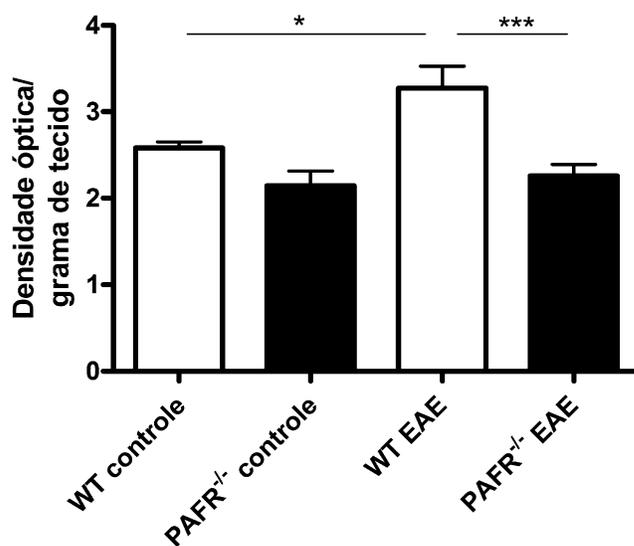


Gráfico 3 Atividade da enzima NAG no tronco encefálico de camundongos WT e PAFR^{-/-} na fase aguda da EAE. Os resultados foram expressos em densidade óptica (OD) da reação enzimática por grama de tecido cerebral. Os resultados foram submetidos à análise ANOVA com pós-teste Bonferroni e apresentam aumento significativo entre animais WT e PAFR^{-/-} com EAE (*p<0.05; ***p<0.001).

4.1.4. Rolamento e adesão de células em animais PAFR^{-/-} são similares aos animais WT

Utilizou-se a técnica de microscopia intravital no intuito de se verificar se as alterações clínicas e patológicas poderiam ser explicadas pela alteração no número de células rolando e aderindo no endotélio vascular. Após 14 dias, os animais WT apresentaram um aumento significativo de células rolando (células/min, média±EM; 22.42±3.31) e aderindo (células/100µm; 7.33±0.83) ao endotélio quando comparadas aos animais controles (Gráfico 4 – Rolamento: 0.83±0.29; Adesão: 0.89±0.32). O aumento nestes parâmetros está associado com o aumento de infiltrado de células no sistema nervoso central, uma vez que rolamento e adesão são dois passos essenciais para o recrutamento de células para o tecido. No entanto, estes parâmetros foram idênticos nos animais PAFR^{-/-} com EAE (Rolamento: 15.54±2.49; Adesão: 7.44±0.71) em comparação aos animais WT com EAE, como pode ser verificado no Gráfico 4.

Portanto, os parâmetros de rolamento e adesão não são influenciados pela ausência do receptor de PAF e não explicam a alteração do padrão de infiltrado celular.

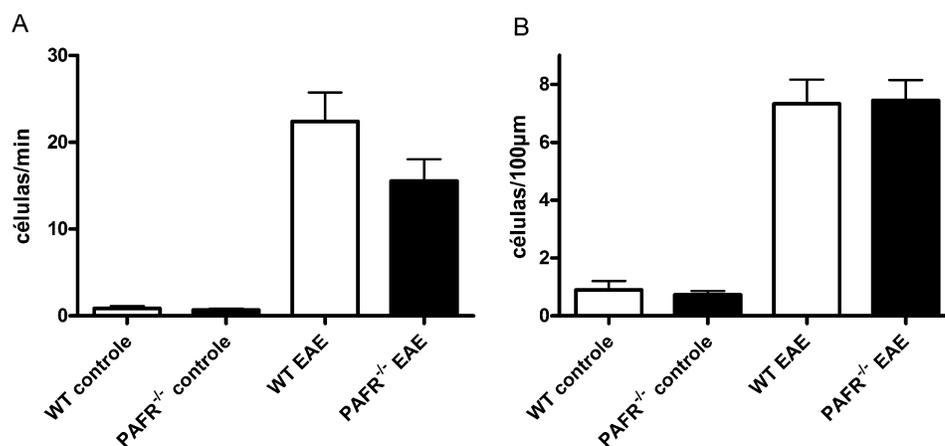


Gráfico 4 Visualização de interações leucócito-endotélio no pico da EAE. Microscopia intravital foi utilizada para avaliar rolamento e adesão de leucócitos na microvasculatura cerebral. O protocolo incluía camundongos de grupo controle (WT=4, PAFR^{-/-}=4), WT EAE (n=4) e PAFR^{-/-} EAE (n=9) no dia 14 pós-imunização. Os dados estão indicados como média±EM de células por minuto (para rolamento) e células por µm (para adesão).

4.1.5. Citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias não estão aumentadas nos animais PAFR^{-/-} induzidos com EAE

Para investigar que outros fatores poderiam estar envolvidos nas alterações nos animais deficientes de receptor de PAF, foram realizadas análises de citocinas e quimiocinas que estão elevadas durante a EAE. As moléculas foram quantificadas por ELISA utilizando-se tecido cerebral dos animais. Como esperado, animais WT apresentaram elevados níveis de IL-17 (média±EM; 175.60±12.64), CCL2 (128.40±7.11) e CCL5 (882.40±39.61) em comparação aos controles sem EAE (IL-17: 117.40±9.50; CCL2: 43.45±4.37; CCL5: 479.40±36.02), como pode ser visto no Gráfico 5. No entanto, as mesmas citocinas e quimiocinas nos camundongos PAFR^{-/-} com EAE estão em níveis significativamente menores (IL-17: 146.50±5.08; CCL2: 49.99±1.65; CCL5: 590.70±17.66) do que nos animais WT EAE. Animais PAFR^{-/-} sem EAE apresentam níveis semelhantes destas citocinas e quimiocinas (IL-17: 157.00± 16.40; CCL2: 54.85± 3.79; CCL5: 632.9±46.72) em comparação aos controles WT.

Desse modo, verifica-se que há diminuição de moléculas pró-inflamatórias nos animais PAFR^{-/-} com EAE.

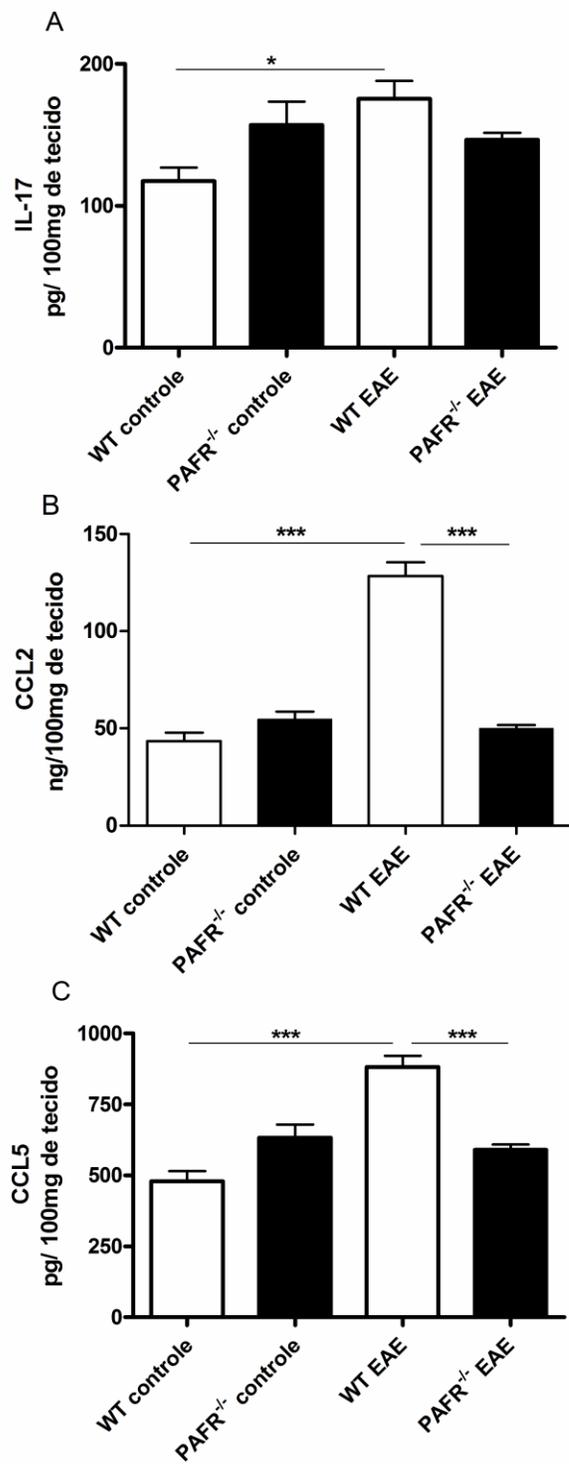


Gráfico 5 Produção de IL17, CCL2 e CCL5 no sistema nervoso central de camundongos com EAE. As concentrações de proteína foram medidas em extratos de cérebro por ELISA após 14 dias de indução de EAE. O ensaio foi realizado em animais EAE (WT=6; PAFR^{-/-}=7) e grupo sham (WT=4, PAFR^{-/-}=5) para IL-17 (A), CCL2 (B) e CCL5 (C). Os resultados estão expressos como média±EM. Diferenças estatisticamente significativas foram indicadas por *p<0.05 e ***p<0.001.

4.1.6. Células CD4⁺ e células secretoras de IL-17 estão reduzidas no cérebro de animais PAFR^{-/-} induzidos com EAE

Foi realizado o isolamento e marcação de células para se definir que tipo celular estaria infiltrando o sistema nervoso central. Animais WT induzidos com EAE apresentaram níveis elevados de células CD4⁺ (percentagem de CD4⁺; média±EM: 10.13± 4.64) e um aumento na marcação de células produtoras de IL-17 (5.95±1.24) após 14 dias de indução. Em animais PAFR^{-/-}, houve uma redução de CD4⁺ (1.27±0.70) e IL-17 (0.94± 0.37) quando comparados aos animais WT, como pode ser verificado no Gráfico 6.

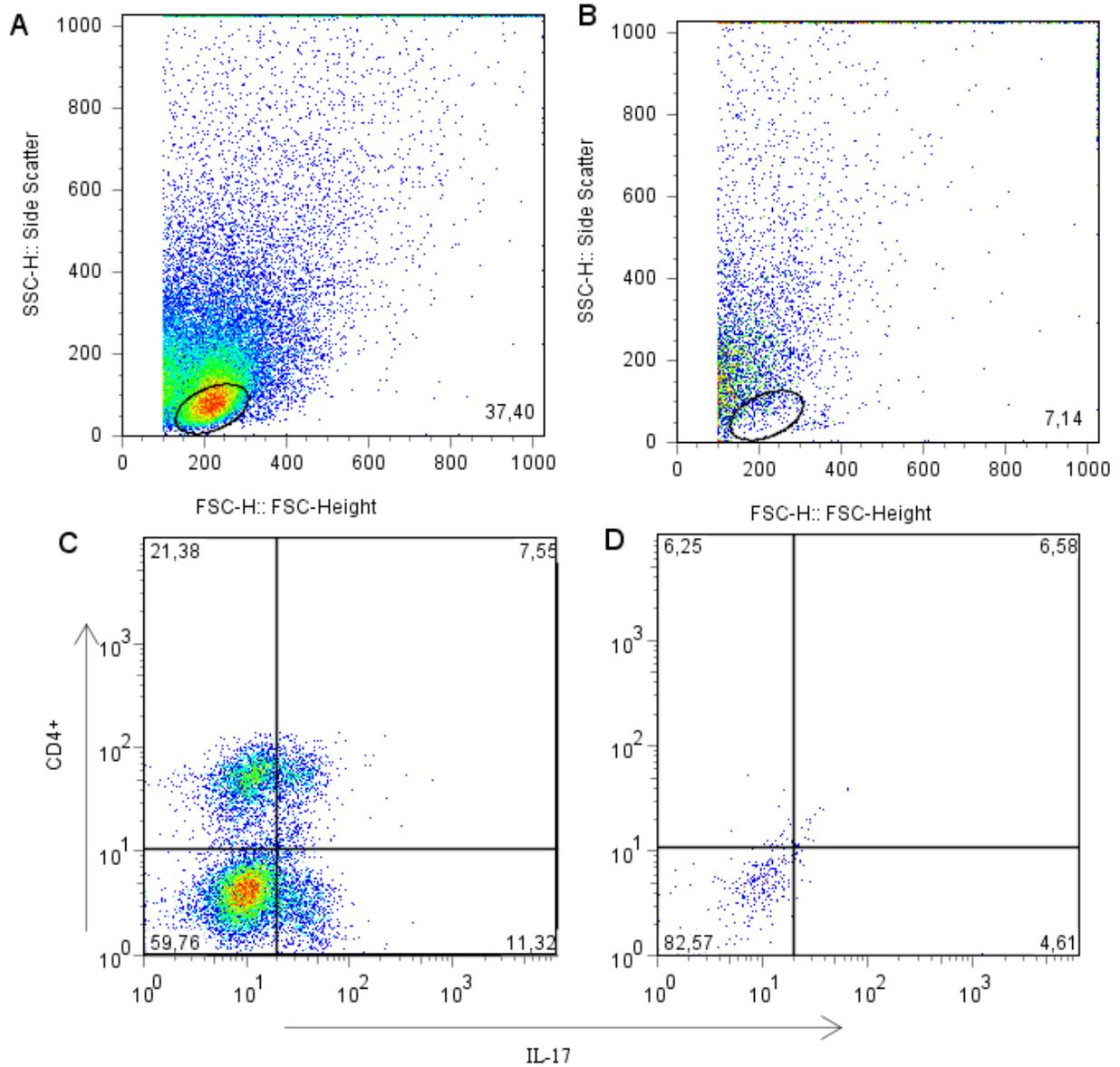


Gráfico 6 Gráficos dot plot e formação dos “gates” na análise de citometria de fluxo. Os resultados são representativos do grupo WT EAE (A e C; n=4) e PAFR^{-/-} EAE (B e D; n=2) e foram obtidos a partir de cérebro de animais após 14 dias de indução de EAE. Os “gates” (elipses) formados em A e B correspondem à população linfocitária.

4.2. Resultados utilizados no artigo aceito para publicação intitulado “Behavioral investigation of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis”

4.2.1. Não há alteração no consumo de sacarose 2% após indução de EAE

Animais WT saudáveis naturalmente preferem o consumo de sacarose 2% quando há esta solução e água potável disponíveis. EAE foi induzida em animais WT e o consumo de sacarose 2% foi registrado neste grupo e em animais controles, sem EAE. Não foi encontrada diferença significativa ($p=0.39$) de consumo diário de sacarose 2% entre os dois grupos (em mL, controles: 1.93 ± 0.12 ; EAE: 1.84 ± 0.11), como pode ser visto no gráfico 7.

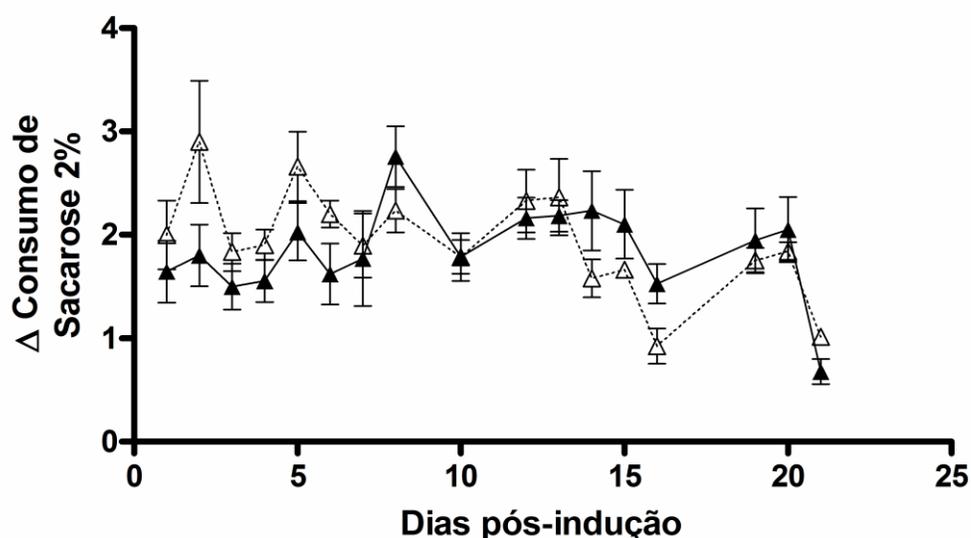


Gráfico 7 Efeito da EAE no consumo de sacarose 2%. Animais controles (▲) e induzidos com EAE (●) foram monitorados medindo-se o consumo de sacarose 2% ao longo de 21 dias de indução da EAE. Não houve diferenças no consumo de sacarose entre os dois grupos. Controles, $n=6$. EAE, $n=8$.

4.2.2. Ansiedade nos animais $PAFR^{-/-}$ é menor e é revertida após indução de EAE

Além da avaliação clínica, foram realizados também testes comportamentais, para avaliar possíveis efeitos da EAE no comportamento dos animais. Após 9 dias de indução, os animais

foram submetidos ao teste do labirinto elevado em cruz. Nenhum dos animais apresentava debilidade motora neste dia. Surpreendentemente, os animais PAFR^{-/-} não induzidos apresentaram maior exploração dos braços abertos (em segundos; 51.60±14.20) quando comparados aos animais WT não induzidos (18.70±5.00). Não houve diferença entre os animais WT não-induzidos e WT EAE (10.30±3.10). No entanto, a diferença encontrada entre os animais não induzidos WT e PAFR^{-/-} parece desaparecer após 9 dias de indução de EAE, uma vez que animais WT EAE e PAFR^{-/-} EAE (8.00±2.90) não apresentaram diferenças significativas de exploração dos braços abertos (Gráfico 8).

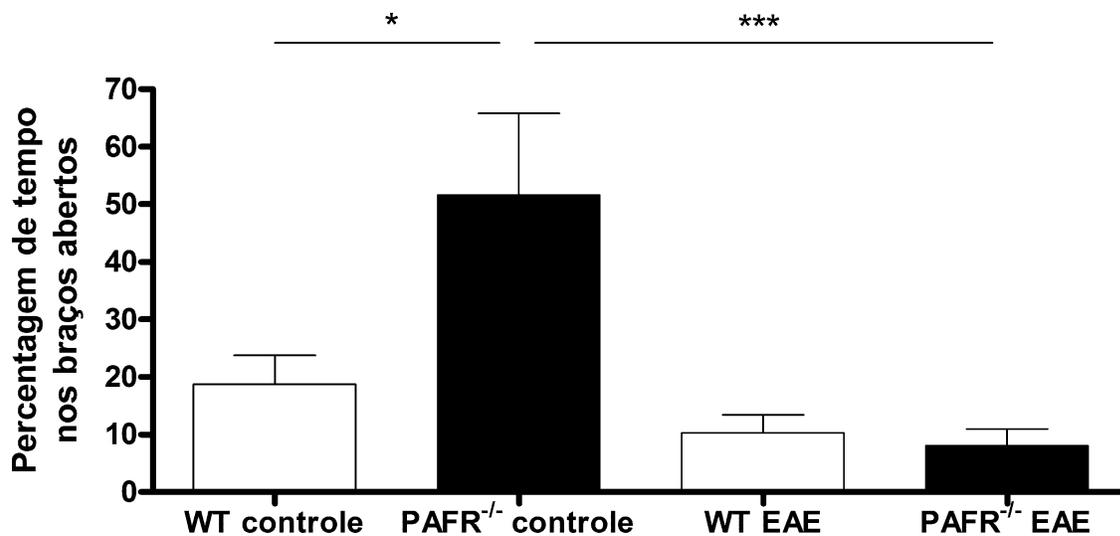


Gráfico 8 Tempo nos braços abertos do labirinto elevado em cruz de animais WT e PAFR^{-/-}. Animais controles não foram induzidos com EAE e animais EAE foram avaliados após 9 dias de indução. Animais PAFR^{-/-} controles (n=8) exploraram mais os braços abertos que os animais WT controles (n=10). Diferenças significativas foram expressas como *p<0.05; ***p<0.001.

4.2.3. Ansiedade de animais PAFR^{-/-} machos sem doença é semelhante a animais WT

Após encontrar diferença entre animais WT e PAFR^{-/-} fêmeas nos níveis basais de ansiedade, objetivou-se verificar se esta diferença é dependente do sexo dos animais. Assim, foi realizado o teste do labirinto elevado em cruz em machos WT e PAFR^{-/-} sem doença. Não foram encontradas diferenças significativas entre os dois grupos (p=0.30), o que sugere um efeito gênero-específico das diferenças de ansiedade entre os animais WT e PAFR^{-/-}, como pode ser verificado no Gráfico 9.

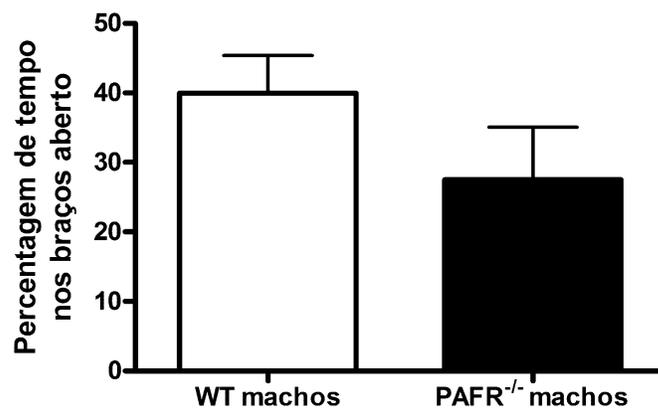


Gráfico 9 Labirinto elevado em cruz de animais WT e PAFR^{-/-} machos. Não se induziu EAE nos animais. Não foram encontradas diferenças significativas entre animais WT e PAFR^{-/-} (n=6 para ambos os grupos).

4.2.4. Não há alteração na ansiedade em animais WT induzidos com EAE na fase crônica

Além de avaliar os animais antes do início dos sinais clínicos, eles foram avaliados cerca de dois meses após a indução da EAE. Como pode ser visto no Gráfico 10, a gravidade clínica permanece a mesma após vários dias de remissão.

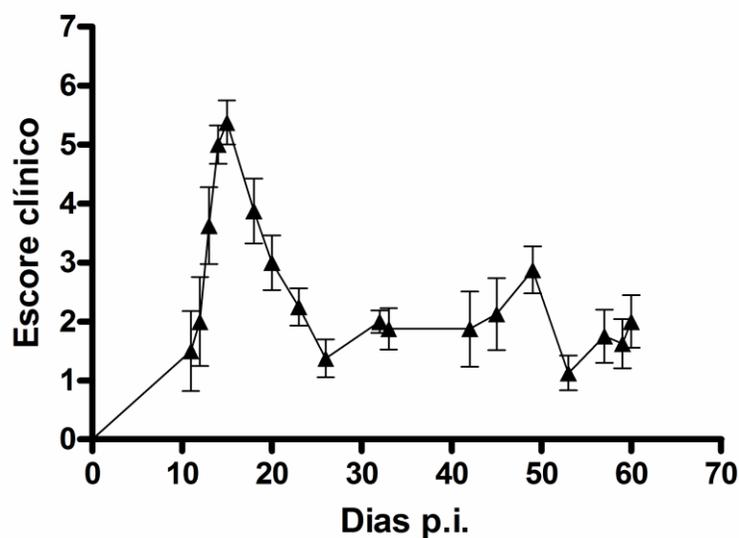


Gráfico 10 Evolução clínica da EAE após 60 dias de imunização (fase crônica). Animais WT foram induzidos com EAE e a progressão da doença foi monitorada utilizando o sistema 3 de escores, descrito por Weaver *et al.* (2005). Não houve alteração significativa do escore clínico após o dia 25 de indução.

Ao final deste período, os animais foram submetidos ao teste do labirinto elevado em cruz. No entanto, como pode ser verificado no Gráfico 11, não houve alteração significativa na exploração do braço aberto pelos animais WT quando comparados aos animais controles.

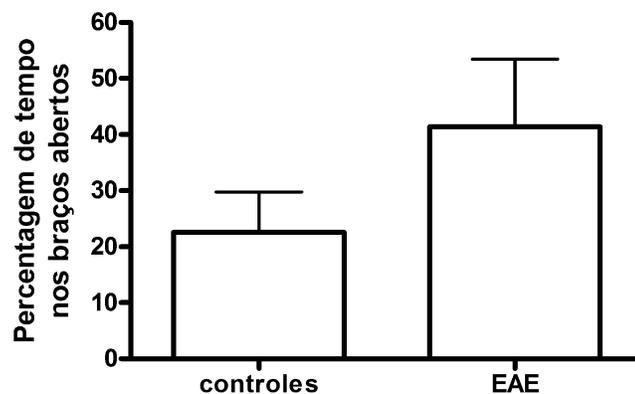


Gráfico 11 Tempo nos braços abertos do labirinto elevado em cruz na fase crônica da EAE. Animais controles não induzidos com EAE e animais EAE foram avaliados após 60 dias de indução da EAE. Não houve diferença significativa entre animais controles e EAE (n=8; p=0.30).

4.2.5. Não há alteração na memória na fase crônica da EAE

Além do teste de ansiedade, os animais WT, após 60 dias de EAE, foram submetidos a análise pelo teste de reconhecimento de objetos, que constitui um parâmetro de memória. Não foram encontradas diferenças significativas na exploração do novo objeto por animais induzidos com EAE tanto após 1h30min (em segundos; média±EM; 53.80±4.30) quanto após 24h (45.90±3.30) de exposição ao 1º objeto ($p=0.17$), como pode ser verificado no Gráfico 12.

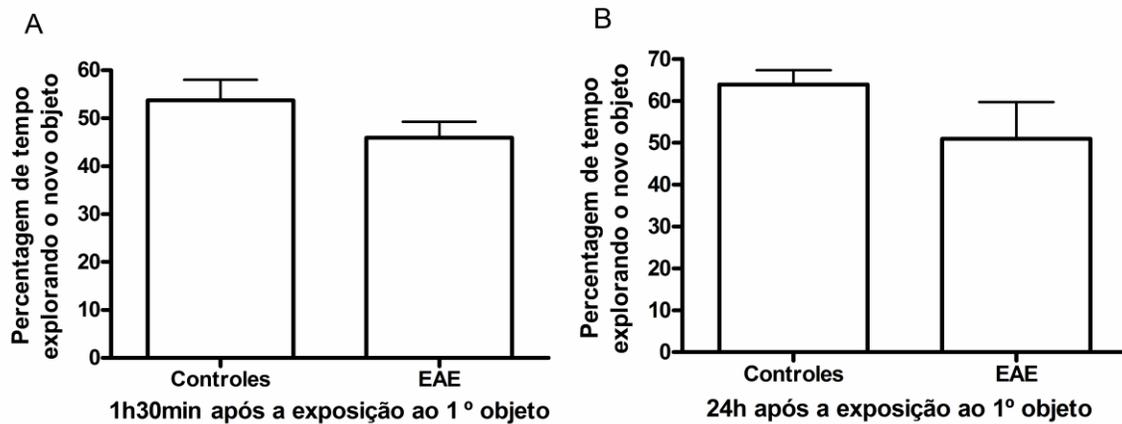


Gráfico 12 Tempo de exploração do novo objeto de animais controles e EAE após 60 dias de indução. Os animais são expostos ao objeto inicial e, após 1h30min (A) e 24h (B), eles são expostos a um novo objeto, juntamente com o objeto antigo. Não houve diferença entre os animais não induzidos (controles, $n=8$) e induzidos ($n=8$) com EAE ($p=0.17$).

5. Discussão

5.1. Discussão de resultados publicados no artigo científico intitulado “Absence of PAF receptor alters cellular infiltrate but not rolling and adhesion of leukocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis”

Neste trabalho, mostrou-se que a ausência do receptor de PAF atenua a EAE em associação com o aumento de neutrófilos e eosinófilos e diminuição do infiltrado de células mononucleares no sistema nervoso central. A mudança do infiltrado celular está associada com os níveis de citocinas e quimiocinas no sistema nervoso central e é independente de rolamento e adesão de leucócitos na microvasculatura cerebral.

A indução de EAE resulta em paresia e paralisia nos animais WT seguido de resolução da doença por recuperação parcial dos sinais clínicos. A menor gravidade da doença nos animais sem o receptor de PAF confirmou estudos anteriores de Kihara e colaboradores (2005), que relataram menor incidência e gravidade de sintomas motores em camundongos PAFR^{-/-}. É importante comentar, como demonstrado por Jones e colaboradores (2008) que o escore clínico constitui um dos métodos mais eficazes na avaliação dos sinais motores da EAE. Este grupo demonstrou que testes mais complexos como o “Rota Rod” e o “Grip Strength”, que dependem de valores registrados pelo aparelho e não da avaliação do examinador, são tão informativos quanto os escores clínicos, mas são muito mais laboriosos.

Os sinais clínicos na EAE se desenvolvem devido à perda de mielina e de axônios no sistema nervoso central (Wujek *et al.*, 2002). Acredita-se que células mononucleares, que transmigram para sistema nervoso central, sejam os efetores dessa perda de axônios e mielina (Zeine e Owens, 1992). De fato, já se demonstrou que, neste modelo de EAE induzido por MOG₃₅₋₅₅, há um infiltrado celular marcante nas meninges e no parênquima da medula espinhal (Kuerten *et al.*, 2007). Camundongos PAFR^{-/-} induzidos com EAE apresentaram menor quantidade de células mononucleares na medula espinhal e no tronco encefálico quando comparados com os animais WT, sugerindo que a ausência do receptor de PAF está alterando o recrutamento destas células no sistema nervoso central. Por outro lado, a presença de neutrófilos e eosinófilos no sistema nervoso central de animais PAFR^{-/-} revela uma tendência a um recrutamento de leucócitos polimorfo-

nucleares nestes camundongos. Wu e colaboradores (2010) encontraram números elevados de neutrófilos no sistema nervoso central durante o início e o pico da EAE, sugerindo que neutrófilos contribuiriam para o agravamento da doença. Além disso, Kang e colaboradores (2010) encontraram que células T CD4⁺ recrutadas por astrócitos são essenciais para o início da EAE. Assim, é possível especular que os neutrófilos no sistema nervoso central em camundongos PAFR^{-/-} possam precisar de sinais provenientes de células mononucleares (por exemplo, T CD4⁺) para promover o dano tecidual. Não se pode ignorar o fato de que o aumento de expressão de β-N-acetilglucosaminidase pode ser consequência de alterações na ativação de micróglia, uma vez que esta célula também expressa a enzima supracitada (Beccari *et al.*, 1997).

Uma possível explicação para o menor infiltrado de células mononucleares poderia ser o menor nível de adesão e rolamento destas células na microvasculatura do sistema nervoso central. Para avaliar os passos de rolamento e adesão no recrutamento de leucócitos, foi realizada a microscopia intravital na microvasculatura cerebral na fase aguda da EAE em animais WT. Animais WT induzidos com EAE apresentaram níveis aumentados de leucócitos em rolamento e adesão, uma confirmação de resultados já obtidos por nosso grupo de pesquisa (dos Santos *et al.*, 2005; Rodrigues *et al.*, 2010). Surpreendentemente, camundongos PAFR^{-/-} apresentaram níveis similares de adesão e rolamento leucocitários quando comparados a animais WT. Rolamento e adesão são passos do recrutamento que dependem da expressão de uma série de moléculas de adesão e são influenciadas pela presença de quimiocinas no tecido (Schenkel *et al.*, 2004). Por sua vez, a migração e a sobrevivência de células que migraram para o parênquima tecidual dependem de outras classes de moléculas. Assim, é possível que o receptor de PAF não seja relevante para a expressão de selectinas e integrinas, responsáveis pelo rolamento e adesão, após a indução de EAE. Os altos níveis de neutrófilos e eosinófilos no sistema nervoso central de animais PAFR^{-/-} poderiam indicar que as células rolando e aderindo ao endotélio nestes animais sejam neutrófilos e eosinófilos, enquanto a maioria das células rolando e aderindo nos animais WT são de linhagem mononuclear. Infelizmente, a rodamina marca todos os tipos de leucócitos (Villringer *et al.*, 1991), assim, não é possível afirmar se os leucócitos rolando e aderindo são mononucleares ou polimorfonucleares. É de relevância notar que a rodamina não altera as funções leucocitárias (Lorenzl *et al.*, 1993; Dirnagl *et al.*, 1994).

Células encefalitogênicas sintetizam moléculas que recrutam e ativam mais células para invadir o sistema nervoso central (Reboldi *et al.*, 2009). Foi estabelecido que os camundongos

induzidos com EAE apresentaram elevados níveis de quimiocinas e citocinas no tecido nervoso na fase mais grave da doença (Fife *et al.*, 2001; Juedes *et al.*, 2000; Ambrosini *et al.*, 2003). Confirmou-se a presença de elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas nos camundongos WT induzidos com EAE. No entanto, os camundongos PAFR^{-/-} apresentaram níveis comparáveis aos animais controles em todas as quimiocinas e citocinas medidas, sugerindo que as células encefalitogênicas nestes camundongos não estavam sintetizando estas moléculas. A falta do receptor de PAF pode estar prejudicando a liberação de IL-17 pelos astrócitos, que são uma das células responsáveis pela produção desta citocina no início da EAE (Kang *et al.*, 2010). Além disso, baixos níveis de quimiocinas e citocinas podem ser uma consequência da falta de células mononucleares do sistema nervoso central. De fato, células CD4⁺ também produzem IL-17 (Infante-Duarte *et al.*, 2000) e estão reduzidas tanto em número quanto proporcionalmente nos animais PAFR^{-/-} induzidos com EAE. Além disso, é possível que a via de sinalização pelo PAF possa favorecer a diferenciação para o perfil Th17 (Edwards e Constantinescu, 2009), embora a ligação entre ambos ainda não esteja clara.

A partir daí, surgem algumas hipóteses de trabalho que estão sendo investigadas no momento e que constituem perspectivas futuras de estudo. Aparentemente, a ativação e proliferação das células encefalitogênicas em animais PAFR^{-/-} não está afetada, como verificado por Kihara e colaboradores (2005). Assim, o foco dos próximos experimentos será tentar definir quais os tipos celulares que estejam presentes no sistema nervoso central de animais WT e ausentes em animais PAFR^{-/-}, e se há alterações no processo de migração destas células. É provável que os linfócitos B não estejam envolvidos, pois já se demonstrou que, neste modelo de EAE, eles não respondem ao peptídeo MOG₃₅₋₅₅ (Lyons, *et al.*, 1999) apesar de provocarem lesão quando são ativados *ex vivo* com MOG₃₅₋₅₅ (Sun *et al.*, 2001). Uma das hipóteses é de que os linfócitos CD4⁺ possam não estar migrando para o tecido pela ausência de sinais pró-inflamatórios no sistema nervoso central de camundongos PAFR^{-/-}. Para isso, será necessário verificar se há alteração na migração desse tipo de célula a partir de moléculas quimiotáticas. Outra hipótese seria uma possível alteração presente no sistema nervoso central dos animais PAFR^{-/-} que pudesse estar dificultando a ativação e/ou migração de células encefalitogênicas para o tecido. Neste caso, seria necessário gerar quimeras, destruindo as células da medula óssea dos camundongos e gerando animais WT recebendo células da medula óssea de animais PAFR^{-/-} e animais PAFR^{-/-} recebendo células de ani-

mais WT. No entanto, há limitações para esse experimento, especialmente relacionadas ao elevado número de animais necessários para a realização do mesmo.

5.2. Discussão dos resultados mostrados no artigo aceito para publicação intitulado: “Behavioral investigation of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis”

Não foi encontrada nenhuma alteração comportamental evidente nos animais WT induzidos com EAE, tanto antes da fase aguda, como após a remissão dos sinais clínicos. No entanto, surpreendentemente, foi encontrada uma diferença no nível de ansiedade entre os animais WT e os animais PAFR^{-/-}, sugerindo que este receptor apresente um papel importante no mecanismo de indução de ansiedade.

Apesar de tradicionalmente relacionada a alterações motoras, nos últimos anos alguns trabalhos relataram alterações comportamentais na EAE. Pollak e colaboradores (2002) cunharam a expressão Síndrome Comportamental Associada à EAE para se referir ao conjunto de alterações comportamentais que ocorrem durante o desenvolvimento da doença. Entre as alterações comportamentais já descritas, incluem-se menor interação social e alterações no consumo de sacarose pelos animais (Pollak *et al.*, 2000). Além dessas alterações, relatou-se uma correlação entre os sinais da síndrome comportamental e aumento de algumas citocinas, como IL1 β e TNF α (Pollak *et al.*, 2003).

Entretanto, não foi encontrada esta síndrome comportamental no presente trabalho, uma vez que não se verificou alteração no consumo de sacarose pelos animais com EAE. É possível que as condições nas quais a sacarose 2% estava disponível não sejam as mais adequadas, pois ao beber a solução o animal poderia derramar um pouco do conteúdo na gaiola, provocando erros na medida. Além disso, os recipientes onde estavam contidas as soluções de sacarose podem apresentar diferenças na quantidade de líquido que sai quando o animal vai beber a solução. Uma das maneiras de se contornar estes problemas é utilizando as chamadas gaiolas metabólicas, nas quais é possível se registrar perdas de solução que ocorram durante o momento em que o animal está bebendo. Experimentos futuros utilizando estas gaiolas estão planejados.

Mesmo não encontrando alterações que correspondessem à síndrome comportamental da EAE, foram realizados experimentos avaliando outros parâmetros comportamentais. Alterações no sistema imune que possam interferir no comportamento foram descritas em modelos experimentais, principalmente em infecções virais e bacterianas, nas quais o fenótipo comportamental é denominado “*sickness behaviour*” (comportamento de doente – tradução literal da expressão;

Kent *et al.*, 1992). Lacosta e colaboradores (1999) encontraram efeitos ansiogênicos (aumento de ansiedade) em camundongos com administração sistêmica de LPS, mostrando que pode haver aumento de ansiedade em respostas inflamatórias. Nesse contexto, foi surpreendente que não se encontrou nenhuma alteração nos níveis de ansiedade tanto antes do início dos sinais clínicos, como após a fase crônica da EAE. A avaliação dos animais durante o estágio mais grave da doença é dificultada pela completa paralisia de membros posteriores nos camundongos. Mesmo antes do aparecimento da debilidade motora, há alterações significativas no número de células T (marcadas com anti-CD3) e fagócitos (microglia/macrófago) no sistema nervoso central (Jones *et al.*, 2008). Após alguns meses da indução da EAE, a quantidade de células T e fagócitos diminui, mas ainda permanece significativamente maior que nos animais controles (Jones *et al.*, 2008). Células T são capazes de produzir citocinas e quimiocinas que, acredita-se, influenciem a atividade de neurônios (Adler *et al.*, 2007). Assim, a hipótese era de que tanto antes como após o desenvolvimento dos sinais clínicos, estas células pudessem estar sintetizando citocinas que, por sua vez, estariam agindo sobre estruturas no sistema nervoso central. Uma possível explicação para a ausência de efeitos no comportamento seria a possibilidade de o sistema nervoso central controlar o perfil de citocinas das células T durante a EAE, algo já descrito por Krakowski e Owens (1997). Assim, na fase aguda da doença, na presença de elevado número de células T, o sistema nervoso central não seria capaz de conter os efeitos provocados pelos mediadores secretados por estas células. Após esse estágio crítico, a diminuição da resposta permitiria que o sistema entrasse em equilíbrio, controlando-se os possíveis efeitos que mediadores inflamatórios pudessem ter sobre estruturas do sistema nervoso central.

Outro parâmetro avaliado foi memória episódica de curta e longa duração dos animais na fase crônica da EAE. O modelo de avaliação de memória por reconhecimento de objetos foi padronizado para roedores pela primeira vez por Ennaceur e Delacour (1988). Posteriormente, Messier (1997) validou a utilização do modelo em camundongos, consolidando o teste de reconhecimento de objetos para avaliação de memória em camundongos. Lesões corticais e hipocâmpais são encontradas no cérebro de pacientes com esclerose múltipla (Calabrese *et al.*, 2010; Sicotte *et al.*, 2008) assim como em animais com EAE (Pomeroy *et al.*, 2010; Ziehn *et al.*, 2010). Logo, surge a hipótese de perda de memória após a fase aguda da EAE, o que permitiria utilizá-la como um modelo para se medir seqüelas de pacientes após períodos de surto da esclerose múltipla. A ausência de qualquer diferença entre a memória de animais EAE comparados aos controles sugere

re que as lesões hipocampais neste modelo sejam mínimas. Este resultado contrasta com dados obtidos por Ziehn e colaboradores (2010), que encontraram diminuição de volume da camada CA1, perda de interneurônios inibitórios e aumento da morte de neurônios e glia no hipocampo. É possível que tais lesões ocorram apenas durante a fase mais grave da EAE e, após a remissão, a área se recupere por completo. Assim, conclui-se que não há perda de memória após a remissão da EAE.

Em resumo, este estudo não conseguiu detectar alterações comportamentais significativas no modelo de EAE. Portanto, as possíveis lesões ou alterações ocorridas no sistema nervoso central não são suficientes para alterar o comportamento do animal.

Kihara e Ishii (2000) fizeram a descrição detalhada do fenótipo dos animais PAFR^{-/-}, no entanto, não foi encontrada nenhuma alteração significativa na anatomia do cérebro, na transmissão sináptica excitatória ou na potenciação de longa duração. Portanto, é pouco provável que a diferença encontrada nos níveis de ansiedade tenha relação direta com alguma alteração ontogênica do sistema nervoso central. No entanto, foi encontrada neste trabalho uma alteração significativa na resposta imunológica destes animais à indução de EAE. Esta alteração não se restringe ao modelo de EAE, pois foi relatada em diversas outras condições, como na infecção pelo Dengue (Souza *et al.*, 2009), pela *Leishmania amazonensis* (Santiago *et al.*, 2006) e num modelo de isquemia intestinal (Souza *et al.*, 2003). Vários trabalhos têm mostrado que o sistema imune exerce influência no sistema nervoso central, participando de distúrbios neuropsiquiátricos tanto em humanos (Raison *et al.*, 2010; Söderlund, *et al.*, 2009) como em animais (Godbout *et al.*, 2008). Recentemente, Chen e colaboradores (2010) demonstraram que uma mutação no gene *Hoxb8* em células de origem hematopoiética provocava comportamento similar a transtorno obsessivo compulsivo. Este grupo descobriu que a mutação do gene *Hoxb8* na micróglia era a responsável direta pelo comportamento patológico, demonstrando pela primeira vez a influência direta do sistema imune numa distúrbio neuropsiquiátrico.

Assim, é possível que as alterações nos parâmetros imunológicos encontrados em animais PAFR^{-/-} estejam influenciando o sistema nervoso central destes animais, mesmo na ausência de estímulos pró-inflamatórios.

6. Conclusões

O receptor de PAF é importante para o estabelecimento das lesões no sistema nervoso central no modelo de EAE e, conseqüentemente, é relevante para o surgimento dos sinais clínicos. Ainda não está definido qual o mecanismo pelo qual este receptor atua, mas ele provavelmente não age em vias moleculares que interfiram nas etapas de adesão e rolamento de leucócitos no endotélio vascular. O seu papel parece estar relacionado à migração de células mononucleares, especialmente células CD4⁺, e à produção de fatores por estas células no sistema nervoso central.

Não ocorrem alterações nos níveis de ansiedade e na memória de animais induzidos com EAE antes do estabelecimento dos sinais clínicos ou após a remissão da doença.

7. Referências

- ADLER, M.W.; GELLER, E.B.; CHEN, X.; ROGERS, T.J. Viewing chemokines as a third major system of communication in the brain. *AAPS J.* 7(4):E865-E870, 2006.
- ALLDINGER, S.; WÜNSCHMANN, A.; BAUMGÄRTNER, W.; VOSS, C.; KREMMER, E. Up-regulation of major histocompatibility complex class II antigen expression in the central nervous system of dogs with spontaneous canine distemper virus encephalitis. *Acta Neuropathol.* 92:273–280, 1996.
- ALLEN, S.J.; CROWN, S.E.; HANDEL, T.M. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol.* 25: 787-820, 2007.
- AL-OAMISHI, J.; BASHIR, R.; GENDELMAN, H. E. The cellular immunology of multiple sclerosis. *J Leuk Biol.* 65: 444-452, 1995.
- AMBROSINI, E.; COLUMBA-CABEZAS, S.; SERAFINI, B.; MUSCELLA, A.; ALOISI, F. Astrocytes are the major intracerebral source of macrophage inflammatory protein-3 α /CCL20 in relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis and in vitro. *Glia.* 41: 290-300, 2003.
- BAILEY, P.J. Sponge implants as models. *Methods Enzymol.* 162: 327-334, 1988.
- BARANZINI, S.E.; MUDGE, J.; VAN VELKINBURGH, J.C.; KHANKHANIAN, P.; KHREBTUKOVA, I.; MILLER, N.A.; ZHANG, L.; FARMER, A.D.; BELL, C.J.; KIM, R.W.; MAY, G.D.; WOODWARD, J.E.; CAILLIER, S.J.; MCELROY, J.P.; GOMEZ, R.; PANDO, M.J.; CLENDENEN, L.E.; GANUSOVA, E.E.; SCHILKEY, F.D.; RAMARAJ, T.; KHAN, O.A.; HUNTLEY, J.J.; LUO, S.; KWOK, P.Y.; WU, T.D.; SCHROTH, G.P.; OKSENBERG, J.R.; HAUSER, S.L.; KINGSMORE, S.F. Genome, epigenome and RNA sequences of monozygotic twins discordant for multiple sclerosis. *Nature.* 464(7293):1351-1356, 2010.
- BARLOW, D.H.; CHORPITA, B.F.; TUROVSKY, J. Fear, panic, anxiety, and disorders of emotion. In D. A. Hope (Ed.), *Nebraska Symposium on Motivation: Vol. 43. Perspectives on anxiety, panic and fear* (pp. 251-328). Lincoln: Nebraska University Press, 1996.
- BARTT, R.E. Multiple sclerosis, natalizumab therapy, and progressive multifocal leukoencephalopathy. *Curr Opin Neurol.* 19(4): 341-349, 2006.
- BECCARI T, ORLACCHIO A, COSTANZI E, GRAZIA APPOLLONI M, LAURENZI A, BOCCHINI V. Constitutive expression of beta-N-acetylhexosaminidase in a microglial cell line: transcriptional modulation by lipopolysaccharide and serum factors. *J Neurosci Res.* 50(1):44-49, 1997.
- BELLAVANCE, M.A.; BLANCHETTE, M.; FORTIN, D. Recent advances in blood-brain barrier disruption as a CNS delivery strategy. *AAPS J.* 10(1): 166-177, 2008.
- BENATTI, C.; ALBONI, S.; MONTANARI, C.; CAGGIA, F.; TASCEDDA, F.; BRUNELLO, N.; BLOM, J.M. Central effects of a local inflammation in three commonly used mouse strains with a different anxious phenotype. *Behav Brain Res.* 224(1): 23-34, 2011.

BENVENISTE, J.; HENSON, P.M.; COCHRANE, C.G. Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets. The role of IgE, basophils, and a platelet-activating factor. *J Exp Med.* 136(6): 1356-1377, 1972.

BITO, H.; NAKAMURA, M.; HONDA, Z.; IZUMI, T.; IWATSUBO, T.; SEYAMA, Y.; OGURA, A.; KUDO, Y.; SHIMIZU, T. Platelet-activating factor (PAF) receptor in rat brain: PAF mobilizes intracellular Ca^{2+} in hippocampal neurons. *Neuron.* 9(2): 285-294, 1992.

CALABRESE, M.; ROCCA, M.A.; ATZORI, M.; MATTISI, I.; FAVARETTO, A.; PERINI, P.; GALLO, P.; FILIPPI, M. A 3-year magnetic resonance imaging study of cortical lesions in relapse-onset multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 67(3): 376-383, 2010.

CALLEA, L.; ARESE, M.; ORLANDINI, A.; BARGNANI, C.; PRIORI, A.; BUSSOLINO, F. Platelet activating factor is elevated in cerebral spinal fluid and plasma of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 94(1-2): 212-221, 1999.

CALLEGARO, D.; GOLDBAUM, M.; MORAIS, L., et al. The prevalence of multiple sclerosis in the city of São Paulo, Brazil. *Acta Neurol Scand.* 104: 208-213, 2001.

CAROLA, V.; D'OLIMPIO, F.; BRUNAMONTI, E.; FRANCO MANGIA, F.; RENZI, P. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. *Behavioral Brain Research.* 134: 49-57, 2002.

CARVALHO-TAVARES, J.; HICKEY, M. J.; HUTCHISON, J.; MICHAUD, J.; SUTCLIFFE, I. T.; KUBES, P. A role for platelets and endothelial selectins in tumor necrosis factor- α - induced leukocyte recruitment in the brain microvasculature. *Circ Res.* 87: 1141-1148, 2000.

CHAO, W.; OLSON, M.S. Platelet-activating factor: receptors and signal transduction. *Biochem J.* 292(3): 617-629, 1993.

CHEN, S.K.; TVRDIK, P.; PEDEN, E.; CHO, S.; WU, S.; SPANGRUDE, G.; CAPECCHI, M.R. Hematopoietic origin of pathological grooming in Hoxb8 mutant mice. *Cell.* 141(5): 775-785, 2010.

COMPSTON, A.; EBERS, G.; LASSMANN, H.; McDONALD, J.; MATTHEWS, P. M.; WEKERLE, H. *McAlpine's multiple sclerosis.* 2005. 4. ed. London, UK: Churchill Livingstone.

CORDON-CARDO, C.; O'BRIEN, J. P.; BOCCIA, J.; CASALS, D.; BERTINO, J. R.; MELAMED, M. R. Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human -normal and tumor tissues. *J Histochem Cytochem.* 38(9): 1277-1287, 1990.

DAVIS, M. The role of the amygdala in fear and anxiety. *Annu Rev Neurosci.* 15: 353-375, 1992.

DESRUISSEAU, M.S.; GULINELLO, M.; SMITH, D.N.; LEE, S.C.; TSUJI, M.; WEISS, L.M.; SPRAY, D.C.; TANOWITZ, H.B. Cognitive Dysfunction in Mice Infected with Plasmodium berghei Strain ANKA. *J Infect Dis.* 197: 1-7, 2008.

DIRNAGL, U.; NIWA, K.; SIXT, G.; VILLRINGER, A. Cortical hypoperfusion after global forebrain ischemia in the rat is not caused by microvascular leukocyte plugging. *Stroke*. 25: 1028-1038, 1994.

DOS SANTOS, A. C.; BARSANTE, M. M.; ARANTES, R. M. E.; BERNARD, C. C. A.; TEIXEIRA, M. M.; CARVALHO-TAVARES, J. CCL2 and CCL5 mediate leukocyte adhesion in experimental autoimmune encephalomyelitis—an intravital microscopy study. *J Neuroimmunol*. 162: 122-129, 2005.

DRESCHER, K.M.; SOSNOWSKA, D. Being a mouse in a man's world: what TMEV has taught us about human disease. *Front Biosci*. 13: 3775-3785, 2008.

DURONIO, V. The life of a cell: apoptosis regulation by the PI3K/PKB pathway. *Biochem. J*. 415 (3): 333-344, 2008.

EDWARDS, L.J.; CONSTANTINESCU, C.S. Platelet activating factor/platelet activating factor receptor pathway as a potential therapeutic target in autoimmune diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 8(3): 182-190, 2009.

ENGELHARDT, B. Molecular mechanisms involved in T cell migration across the blood–brain barrier. *J Neural Transm*. 113: 477-485, 2006.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res*. 31(1): 47-59, 1988.

EPPS, H.L.V. Thomas Rivers and the EAE model. *J Exp Med*. 202(1): 4, 2005.

FERREIRA, M.L.B.; MACHADO, M.I.M.; VILELA, M.L., et al. Epidemiology of 118 cases of multiple sclerosis after 15 years of follow-up on the reference center of Hospital da Restauração, Recife, Pernambuco, Brazil. *Arq Neuropsiquiatr* 62: 1027-1032, 2004.

FIFE, B.T.; PANIAGUA, M.C.; LUKACS, N.M.; KUNKEL, S.L.; KARPUS, W.J. Selective CC chemokine receptor expression by central nervous system-infiltration encephalitogenic T cells during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res*. 66(4), 705-714, 2001.

FILE, S.E. Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. *Behav Brain Res*. 125: 151-157, 2001.

FLORIS, S.; BLEZER, E. L. A.; SCHREIBELT, G.; DOÈPP, E.; VAN DER POL, S. M. A.; SCHADEEEEESTERMANS, I. L.; NICOLAY, K.; DIJKSTRA, C. D.; DE VRIES, H. E. Blood-brain barrier permeability and monocyte infiltration in experimental allergic encephalomyelitis – A quantitative MRI study. *Brain*. 127: 616-627, 2004.

FRAGOSO, Y.D.; FIORE, A.P.P. Description and characteristics of 81 patients attending the reference center for multiple sclerosis of the coastal region of São Paulo, Brazil. *Arq Neuropsiquiatr*. 63: 741-744, 2005.

FRIESE, M.A.; MONTALBAN, X.; WILLCOX, N.; BELL, J.I.; MARTIN, R.; FUGGER, L. The value of animal models for drug development in multiple sclerosis. *Brain*. 129(8): 1940-1952, 2006.

GALICIA, G.; KASRAN, A.; UYTENHOVE, C.; DE SWERT, K.; VAN SNICK, J.; CEUPPENS, J.L. Icos deficiency results in exacerbated IL-17 mediated experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Immunol*. 29(4):426-433, 2009.

GHOSE, A. K.; VISWANADHAN, V. N.; WENDOLOSKI, J. J. A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases. *J Combinat Chem*. 1(1): 55-68, 1999.

GLASS, C.K.; SAIJO, K.; WINNER, B.; MARCHETTO, M.C.; GAGE, F.H. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*. 140(6): 918-934, 2010.

GODBOUT, J.P.; MOREAU, M.; LESTAGE, J.; CHEN, J.; SPARKMAN, N.L.; O'CONNOR, J.; CASTANON, N.; KELLEY, K.W.; DANTZER, R.; JOHNSON, R.W. Aging exacerbates depressive-like behavior in mice in response to activation of the peripheral innate immune system. *Neuropsychopharmacol*. 33(10): 2341-2351, 2008.

GOVERMAN, J. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat Rev Immunol*. 9(6): 393-407, 2009.

GUAN, Y.; YU, S.; ZHAO, Z.; CIRIC, B.; ZHANG, G.X.; ROSTAMI, A. Antigen presenting cells treated in vitro by macrophage colony-stimulating factor and autoantigen protect mice from autoimmunity. *J Neuroimmunol*. 192(1-2):68-78, 2007.

HANAHAH, D.J.; DEMOPOULOS, C.A.; LIHER, J.; PINCKARD, R.N. Identification of platelet activating factor isolated from rabbit basophils as acetyl glyceryl ether phosphorylcholine. *J Biol Chem* 255: 5514-5516, 1980.

HICKEY, W. F.; HSU, B. L.; KIMURA, H. T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J Neurosci Res*. 28: 254-260, 1991.

HJELMSTRÖM, P.; JUEDES, A.E.; FJELL, J.; RUDDLE, N.H. B-cell-deficient mice develop experimental allergic encephalomyelitis with demyelination after myelin oligodendrocyte glycoprotein sensitization. *J Immunol*. 161(9): 4480-4483, 1998.

HOSTETTLER, M.E.; KNAPP, P.E.; CARLSON, S.L. Platelet-activating factor induces cell death in cultured astrocytes and oligodendrocytes: involvement of caspase-3. *Glia*. 38(3): 228-239, 2002.

ICHIKAWA, M.; JOHNS, T.G.; LIU, J.; BERNARD, C.C.A. Analysis of the fine B cell specificity during the chronic-relapsing course of a MS-like disease in Lewis rats injected with the encephalitogenic myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide 35-55. *J Immunol*. 157: 919-926, 1996.

INFANTE-DUARTE, C.; HORTON, H.F.; BYRNE, M.C.; KAMRADT, T. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J Immunol*. 165(11): 6107-6115, 2000.

ISHII, S.; SHIMIZU, T. Platelet-activating factor (PAF) receptors and genetically engineered PAF receptor mutant mice. *Progr Lipid Res.* 39: 41-82, 2000.

ISHII S, KUWAKI T, NAGASE T, MAKI K, TASHIRO F, SUNAGA S, CAO WH, KUME K, FUKUCHI Y, IKUTA K, MIYAZAKI J, KUMADA M, SHIMIZU T. Impaired anaphylactic responses with intact sensitivity to endotoxin in mice lacking a platelet-activating factor receptor. *J Exp Med.* 187(11): 1779-1788, 1998.

JONES, M.V.; NGUYEN, T.T.; DEBOY, C.A.; GRIFFIN, J.W.; WHARTENBY, K.A.; KERR, D.A.; CALABRESI, P.A. Behavioral and pathological outcomes in MOG 35-55 experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 199(1-2): 83-93, 2008.

JOHNS, T.G.; KERLERO DE ROSBO, N.; MENON, K.; ABO, S.; GONZALES, M.F.; BERNARD, C.C.A. Demyelinating encephalomyelitis resembling multiple sclerosis after immunisation with a peptide from myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J Immunol.* 154: 5536–5541, 1995.

JUEDES, A.E.; HJELMSTRÖM, P.; BERGMAN, C.M.; NEILD, A.L.; RUDDLE, N.H. Kinetics and cellular origin of cytokines in the central nervous system: insight into mechanisms of myelin oligodendrocyte glycoprotein- induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 164, 419– 426, 2000.

JULIANO, R.L.; LING, V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta.* 455(1): 152-62, 1976.

KABAT, E.A.; WOLF, A.; BEZER, A.E. Rapid Production of Acute Disseminated Encephalomyelitis in Rhesus Monkeys by Injection of Brain Tissue With Adjuvants. *Science.* 104(2703): 362-363, 1946.

KANG, Z.; ALTUNTAS, C.Z.; GULEN, M.F.; LIU, C.; GILTIAY, N.; QIN, H.; LIU, L.; QIAN, W.; RAN-SHOFF, R.M.; BERGMANN, C.; STOHLMAN, S.; TUOHY, V.K.; LI, X. Astrocyte-restricted ablation of interleukin-17-induced Act1-mediated signaling ameliorates autoimmune encephalomyelitis. *Immunity.* 32(3): 414-25, 2010.

KENT, S.; BLUTHE, R.M.; KELLEY, K.W.; DANTZER, R. Sickness behavior as a new target for drug development. *Trends Pharmacol. Sci.* 13(1); 24–28, 1992.

KEMPER, E.M.; BOOGERD, W.; THUIS, I.; BEIJEN, J.H.; VAN TELLINGEN, O. Modulation of the blood-brain barrier in oncology: therapeutic opportunities for the treatment of brain tumours? *Cancer Treat Rev.* 30(5): 415-423, 2004.

KIHARA, Y.; ISHII, S.; KITA, Y.; TODA, A.; SHIMADA, A.; SHIMIZU, T. Dual phase regulation of experimental allergic encephalomyelitis by platelet-activating factor. *J Exp Med.* 202(6): 853-863, 2005.

KORN, T.; OUKKA, M.; KUCHROO, V.; BETTELLI, E. Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. *Semin Immunol.* 19(6): 362-71, 2007.

- KRAKOWSKI, M.L.; OWENS, T. The central nervous system environment controls effector CD4⁺ T cell cytokine profile in experimental allergic encephalomyelitis. *Eur J Immunol.* 27(11): 2840-2847, 1997.
- KROLL, R.A.; NEUWELT, E.A. Outwitting the blood-brain barrier for therapeutic purposes: osmotic opening and other means. *Neurosurgery.* 42(5): 1083-1099, 1998.
- KUCHROO, V.K.; ANDERSON, A.C.; WALDNER, H.; MUNDER, M.; BETTELLI, E.; NICHOLSON, L.B. T cell response in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): role of self and cross-reactive antigens in shaping, tuning, and regulating the autopathogenic T cell repertoire. *Annu Rev Immunol.* 20: 101-123, 2002.
- KUERTEN, S.; KOSTOVA-BALES, D.A.; FRENZEL, L.P.; TIGNO, J.T.; TARY-LEHMANN, M.; ANGELOV, D.N.; LEHMANN, P.V. MP4- and MOG₃₅₋₅₅-induced EAE in C57BL/6 mice differentially targets brain, spinal cord and cerebellum. *J Neuroimmunol.* 189(1-2): 31-40, 2007.
- KURTZKE, J. F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology.* 33: 1444–1452, 1983.
- LACOSTA, S.; MERALI, Z.; ANISMAN, H. Behavioral and neurochemical consequences of lipopolysaccharide in mice: anxiogenic-like effects. *Brain Res.* 818(2): 291-303, 1999.
- LANA-PEIXOTO, M. A.; CALLEGARO, D.; MOREIRA, M.A.; CAMPOS, G.B.; *et al.* Consenso expandido do BCTRIMS para o Tratamento da esclerose múltipla. *Arq Neuropsiquiatr.* 60(3-B): 881-886, 2002.
- LANGRISH, C.L.; CHEN, Y.; BLUMENSCHN, W.M.; MATTSON, J.; BASHAM, B.; SEDGWICK, J.D.; MCCLANAHAN, T.; KASTELEIN, R.A.; CUA, D.J. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med.* 201(2): 233-240, 2005.
- LAU, A.A.; CRAWLEY, A.C.; HOPWOOD, J.J.; HEMSLEY, K.M. Open field locomotor activity and anxiety-related behaviors in mucopolysaccharidosis type IIIA mice. *Behav Brain Res.* 191: 130–136, 2008.
- LEBAR, R.; BOUTRY, J.M; VINCENT, C.; ROBINEAUX, R.; VOISIN, G.A. Studies on autoimmune encephalomyelitis in the guinea pig. *J Immunol.* 116: 1439–1446, 1976.
- LI, G.; ADESNIK, H.; LI, J.; LONG, J.; NICOLL, R.A.; RUBENSTEIN, J.L.; PLEASURE, S.J. Regional distribution of cortical interneurons and development of inhibitory tone are regulated by Cxcl12/Cxcr4 signaling. *J Neurosci.* 28:1085–1098, 2008.
- LININGTON, C.; WEBB, M.; WOODHAMS, P. A novel myelin-associated glycoprotein defined by a mouse monoclonal antibody. *J Neuroimmunol.* 6: 387–396, 1984.
- LIPINSKI, C. A. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J Pharmacol Toxicol Meth.* 44(1): 235–249, 2000.

- LOCK, C.; HERMANS, G.; PEDOTTI, R.; BRENDOLAN, A.; SCHADT, E.; et al. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med.* 8: 500-508, 2002.
- LORENZL, S.; KOEDEL, U.; DIRNAGL, U.; RUCKDESCHEL, G.; PFISTER, H.W. Imaging of leukocyte-endothelium interaction using in vivo confocal laser scanning microscopy during the early phase of experimental pneumococcal meningitis. *J Infect Dis.* 168: 927–933, 1993.
- LUCCHINETTI, C.; BRÜCK, W.; PARISI, J.; SCHEITHAUER, B.; RODRIGUEZ, M.; LASSMANN, H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol.* 47(6):707-17, 2000.
- LUSTER, A.D.; ALON, R.; VON ANDRIAN, U.H. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol.* 6 (12):1182-90, 2005.
- LYONS, J.A.; SAN, M.; HAPP, M.P.; CROSS, A.H. B cells are critical to induction of experimental allergic encephalomyelitis by protein but not by a short encephalitogenic peptide. *Eur J Immunol.* 29(11): 3432-3439, 1999.
- MATUSEVICIUS, D.; KIVISÄKK, P.; HE, B.; KOSTULAS, N.; OZENCI, V.; FREDRIKSON, S.; LINK, H. Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 5(2):101-4, 1999.
- MESSIER, C. Object recognition in mice: improvement of memory by glucose. *Neurobiol Learn Mem.* 67(2):172-175, 1997.
- MONTRUCCHIO, G.; ALLOATTI, G.; CAMUSSI, G. Role of platelet-activating factor in cardiovascular pathophysiology. *Physiol Rev.* 80: 1669-1699, 2000.
- MOREIRA MA, TILBERY CP, PEIXOTO MAL, MENDES MF, KAIMEN-MACIEL DR, CALLEGARO D. Aspectos históricos de la esclerosis múltiple. *Rev Neurol Espanha.* 34(4):378-383, 2002.
- MORI, M.; AIHARA, M.; KUME, K.; HAMANOUE, M.; KOHSAKA, S.; SHIMIZU, T. Predominant expression of platelet-activating factor receptor in the rat brain microglia. *J Neurosci.* 16(11): 3590-3600, 1996.
- NATHANSON, J.A.; CHUN, L.L. Immunological function of the blood-cerebrospinal fluid barrier. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86:1684–1688, 1989.
- NEUMANN, I.D.; WEGENER, G.; HOMBERG, J.R.; COHEN, H.; SLATTERY, D.A.; ZOHAR, J.; OLIVIER, J.D.; MATHÉ, A.A. Animal models of depression and anxiety: What do they tell us about human condition? *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 35(6):1357-1375. 2011.
- OSOEGAWA, M.; MIYAGISHI, R.; OCHI, H.; NAKAMURA, I.; NIINO, M.; KIKUCHI, S.; MURAI, H.; FUKAZAWA, T.; MINOHARA, M.; TASHIRO, K.; KIRA, J. Platelet-activating factor receptor gene polymorphism in Japanese patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 161(1-2): 195-198, 2005.

PARDRIDGE, W.M. Molecular biology of the blood-brain barrier. *Mol Biotechnol.* 30(1): 57-70, 2005.

PARK, H.; LI, Z.; YANG, X.O.; CHANG, S.H.; NURIEVA, R.; WANG, Y.H.; WANG, Y.; HOOD, L.; ZHU, Z.; TIAN, Q.; DONG, C. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol.* 6(11): 1133-1141, 2005.

PERSIDSKY, Y.; RAMIREZ, S.H.; HAORAH, J.; KANMOGNE, G.D. Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *J Neuroimmune Pharmacol.* 1(3): 223-236, 2006.

PEDOTTI, R.; DE VOSS, J. J.; YOUSSEF, S.; MITCHELL, D.; WEDEMEYER, J.; MADANAT, R.; GAREN, H.; FONTOURA, P.; TSAI, M.; GALLI, S. J.; SOBEL, R. A.; STEINMAN, L. Multiple elements of the allergic arm of the immune response modulate autoimmune demyelination. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100: 1867-1872, 2003.

PINHO, V.; SOUZA, D.G.; BARSANTE, M.M.; HAMER, F.P.; FREITAS, M.S.; ROSSI, A.G.; TEIXEIRA, M.M. Phosphoinositide-3 kinases critically regulate the recruitment and survival of eosinophils in vivo: importance for the resolution of allergic inflammation. *J Leukoc Biol.* 77: 800-810, 2005.

PODHORNA, J.; BROWN, R.E. Strain differences in activity and emotionality do not account for differences in learning and memory performance between C57BL/6 and DBA/2 mice. *Genes, Brain and Behavior.* 1: 96-110, 2002.

POLLAK, Y.; OVADIA, H.; ORION, E.; WEIDENFELD, J.; YIRMIYA, R. The EAE-associated behavioral syndrome: I. Temporal correlation with inflammatory mediators. *J Neuroimmunol.* 137(1-2): 94-9, 2003.

POLLAK, Y.; ORION, E.; GOSHEN, I.; OVADIA, H.; YIRMIYA, R. Experimental autoimmune encephalomyelitis-associated behavioral syndrome as a model of 'depression due to multiple sclerosis'. *Brain Behav Immun.* 16(5): 533-543, 2002.

POLLAK, Y.; OVADIA, H.; GOSHEN, I.; GUREVICH, R.; MONSA, K.; AVITSUR, R.; YIRMIYA, R. Behavioral aspects of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 104(1): 31-36, 2000.

POMEROY, I.M.; JORDAN, E.K.; FRANK, J.A.; MATTHEWS, P.M.; ESIRI, M.M. Focal and diffuse cortical degenerative changes in a marmoset model of multiple sclerosis. *Mult Scler.* 16(5): 537-548, 2010.

RAINE, C. S.; MCFARLAND, H. F.; TOURTELLOTTE, W. W. Multiple sclerosis. *Clinical and pathological basis.* 1997. London, UK: Chapman & Hall.

RAISON, C.L.; DANTZER, R.; KELLEY, K.W.; LAWSON, M.A.; WOOLWINE, B.J.; VOGT, G.; SPIVEY, J.R.; SAITO, K.; MILLER, A.H. CSF concentrations of brain tryptophan and kynurenines during

immune stimulation with IFN- α : relationship to CNS immune responses and depression. *Mol Psychiatry*. 15(4): 393-403, 2010.

RAMAGOPALAN, S.V.; DOBSON, R.; MEIER, U.C.; GIOVANNONI, G. Multiple sclerosis: risk factors, prodromes, and potential causal pathways. *Lancet Neurol*. 9(7): 727-39, 2010.

REBENKO-MOLL, N.M.; LIU, L.; CARDONA, A.; RANSOHOFF, R.M. Chemokines, mononuclear cells and the nervous system: heaven (or hell) is in the details. *Curr Opin Immunol*. 18(6): 683-689, 2006.

REBOLDI, A.; COISNE, C.; BAUMJOHANN, D. et al. C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat Immunol*. 10:514-523, 2009.

RODRIGUES, David Henrique. **Estudo do papel da enzima fosfatidilinositol-3-cinase- γ na encefalomielite auto-imune experimental**: Instituto de Ciências Biológicas. 2008. 80f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

RODRIGUES, D.H.; VILELA, M.C.; BARCELOS, L.S.; PINHO, V.; TEIXEIRA, M.M.; TEIXEIRA, A.L. Absence of PI3K γ leads to increased leukocyte apoptosis and diminished severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*. 222(1-2): 90-94, 2010.

SADOVNICK, A.D.; YEE, I.M.; GUIMOND, C.; REIS, J.; DYMENT, D.A.; EBERS, G.C. Age of onset in concordant twins and other relative pairs with multiple sclerosis. *Am J Epidemiol*. 170(3): 289-296, 2009.

SANTIAGO, H. C.; PIRES, M. F. B.; SOUZA, D. G.; ROFFE, E.; CÔRTEZ, D. F.; TAFURI, W. L.; TEIXEIRA, M. M.; VIEIRA, L. Q. Platelet activating factor receptor-deficient mice present delayed interferon- γ upregulation and high susceptibility to *Leishmania amazonensis* infection. *Microbes and infection*. 8: 2569-2577, 2006.

SAVARIN-VUAILLAT, C.; RANSOHOFF, R.M. Chemokines and chemokine receptors in neurological disease: raise, retain, or reduce? *Neurotherapeutics*. 4(4): 590-601, 2007.

SCHENKEL, A.R.; MAMDOUH, Z.; MULLER, W.A. Locomotion of monocytes on endothelium is a critical step during extravasation. *Nat Immunol*. 5(4): 393-400, 2004.

SICOTTE, N.L.; KERN, K.C.; GIESSER, B.S.; ARSHANAPALLI, A.; SCHULTZ, A.; MONTAG, M.; WANG, H.; BOOKHEIMER, S.Y. Regional hippocampal atrophy in multiple sclerosis. *Brain*. 131(Pt 4):1134-1141, 2008.

SLAVIN, A.; EWING, C.; LIU, J.; ICHIKAWA, M.; SLAVIN, J.; BERNARD, C.C. Induction of a multiple sclerosis-like disease in mice with an immunodominant epitope of myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Autoimmunity*. 28(2): 109-120, 1998.

SMORODCHENKO, A.; WUERFEL, J.; POHL, E. E.; VOGT, J.; TYSIAK, E.; GLUMM, R.; HENDRIX, S.; NITSCH, R.; ZIPP, F.; INFANTE-DUARTE, C. CNS-irrelevant T-cells enter the brain, cause blood-brain barrier disruption but no glial pathology. *Eur J Neurosci.* 26: 1387-1398, 2007.

SOUZA, D.G.; FAGUNDES, C.T.; SOUSA, L.P.; AMARAL, F.A.; SOUZA, R.S.; SOUZA, A.L.; KROON, E.G.; SACHS, D.; CUNHA, F.Q.; BUKIN, E.; ATRASHEUSKAYA, A.; IGNATYEV, G.; TEIXEIRA, M.M. Essential role of platelet-activating factor receptor in the pathogenesis of Dengue virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(33): 14138-14143, 2009.

SOUZA, D.G.; PINHO, V.; SOARES, A.C.; SHIMIZU, T.; ISHII, S.; TEIXEIRA, M.M. Role of PAF receptors during intestinal ischemia and reperfusion injury. A comparative study between PAF receptor-deficient mice and PAF receptor antagonist treatment. *Br J Pharmacol.* 139(4): 733-40, 2003.

SÖDERLUND, J.; SCHRÖDER, J.; NORDIN, C.; SAMUELSSON, M.; WALTHER-JALLOW, L.; KARLSSON, H.; ERHARDT, S.; ENGBERG, G. Activation of brain interleukin-1beta in schizophrenia. *Mol Psychiatry.* 14(12): 1069-1071, 2009.

STEINMAN, L.; ZAMVIL, S. Virtues and pitfalls of EAE for the development of therapies for multiple sclerosis. *Trends in Immunology.* 26(11): 565-571, 2005.

SUN, D.; WHITAKER, J.N.; HUANG, Z.; LIU, D.; COLECLOUGH, C.; WEKERLE, H.; RAINE, C.S. Myelin antigen-specific CD8+ T cells are encephalitogenic and produce severe disease in C57BL/6 mice. *J Immunol.* 166(12): 7579-7587, 2001.

SVEJGAARD, A. The immunogenetics of multiple sclerosis. *Immunogenetics.* 60(6): 275-286, 2008.

TORKILDSEN, O.; BRUNBORG, L.A.; MYHR, K.M.; BØ, L. The cuprizone model for demyelination. *Acta Neurol Scand Suppl.* 188: 72-76, 2008.

TSAI, H.H.; FROST, E.; TO, V.; ROBINSON, S.; FRENCH-CONSTANT, C.; GEERTMAN, R.; RANSOHOFF, R.M.; MILLER, R.H. The chemokine receptor CXCR2 controls positioning of oligodendrocyte precursors in developing spinal cord by arresting their migration. *Cell.* 110: 373-383, 2002.

TULVING, E. Précis of Elements of episodic memory. *Behav Brain Sciences.* 7: 223-238, 1984.

TUON, L.; COMIM, C.M.; PETRONILHO, F.; BARICHELLO, T.; IZQUIERDO, I.; QUEVEDO, J.; DALPIZZOL, F. Time-dependent behavioral recovery after sepsis in rats. *Intensive Care Medicine.* 34(9): 1724-1731, 2008.

VILLRINGER, A.; DIRNAGL, U.; THEM, A.; SCHÜRER, L.; KROMBACH, F.; EINHÄUPL, K.M. Imaging of leukocytes within the rat brain cortex in vivo. *Microvasc Res.* 42(3): 305-315, 1991.

WEAVER, C. T.; HATTON, R. D.; MANGAN, P. R.; HARRINGTON, L. E. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Ann Rev Immunol.* 25: 821-852, 2007.

WELCH, E.J.; NAIKAWADI, R.P.; LI, Z.; LIN, P.; ISHII, S.; SHIMIZU, T.; TIRUPPATHI, C.; DU, X.; SUBBAIAH, P.V.; YE, R.D. Opposing effects of platelet-activating factor and lyso-platelet-activating factor on neutrophil and platelet activation. *Mol Pharmacol.* 75(1): 227-234, 2009.

WILSON EH, WENINGER W, HUNTER CA. Trafficking of immune cells in the central nervous system. *J Clin Invest.* 120(5):1368-1379, 2010.

WU, F.; CAO, W.; YANG, Y.; LIU, A. Extensive infiltration of neutrophils in the acute phase of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *Histochem Cell Biol.* 133(3): 313-322, 2010.

WUERFEL, J.; TYSIAK, E.; PROZOROVSKI, T.; SMYTH, M.; MUELLER, S.; SCHNORR, J.; TAUPITZ, M.; ZIPP, F. Mouse model mimics multiple sclerosis in the clinico-radiological paradox. *European J Neurosci.* 26: 190–198, 2007.

WUJEK, J.R.; BJARTMAR, C.; RICHER, E.; RANSOHOFF, R.M.; YU, M.; TUOHY, V.K.; TRAPP, B.D. Axon loss in the spinal cord determines permanent neurological disability in an animal model of multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 61(1): 23-32, 2002.

YIRMIYA, R.; GOSHEN, I. Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. *Brain Behav Immun.* 25(2): 181-213, 2011.

ZEINE, R.; OWENS, T. Direct demonstration of the infiltration of murine central nervous system by Pgp-1/CD44^{high} CD45RB^{low} CD4⁺ T cells that induce experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 40(1): 57-69, 1992.

ZHU, S.W.; YEE, B.K.; NYFFELER, M.; WINBLAD, B.; FELDON, J.; MOHAMMEDA, A.H. Influence of differential housing on emotional behaviour and neurotrophin levels in mice. *Behavioral Brain Research.* 169: 10–20, 2006.

ZIEHN, M.O.; AVEDISIAN, A.A.; TIWARI-WOODRUFF, S.; VOSKUHL, R.R. Hippocampal CA1 atrophy and synaptic loss during experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE. *Lab Invest.* 90(5): 774-786, 2010.

ZIEMSEN, T.; SCHREMPF, W. Glatiramer acetate: mechanisms of action in multiple sclerosis. *Int Rev Neurobiol.* 79: 537-570, 2007.

8. Produção científica no período

1. TEIXEIRA, M.M.; VILELA, M.C.; SORIANI, F.M.; RODRIGUES, D.H.; TEIXEIRA, A.L. Using intravital microscopy to study the role of chemokines during infection and inflammation in the central nervous system. *J Neuroimmunol.* 224: 62-65, 2010.
2. RODRIGUES, D.H.; VILELA, M.C.; BARCELOS, L.S.; PINHO, V.; TEIXEIRA, M.M.; TEIXEIRA, A.L. Absence of PI3K γ leads to increased leukocyte apoptosis and diminished severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 222: 90-94, 2010.
3. LACERDA-QUEIROZ, N.; RODRIGUES, D.H.; VILELA, M.C.; MIRANDA, A.S.; AMARAL, D.C.G.; CAMARGOS, E.R.S.; CARVALHO, L.J.M.; HOWE, C.; TEIXEIRA, M.M.; TEIXEIRA, A.L. Inflammatory changes in the central nervous system are associated with behavioral impairment in *Plasmodium berghei* (strain ANKA)-infected mice. *Experimental Parasitology.* 125: 271-278, 2010.
4. VILELA, M.C.; LIMA, G.K.; RODRIGUES, D.H.; LACERDA-QUEIROZ, N.; MANSUR, D.S.; MIRANDA, A.S.; RACHID, M.A.; KROON, E.G.; VIEIRA, L.Q.; CAMPOS, M.A.; TEIXEIRA, M.M.; TEIXEIRA, A.L. TNFR1 plays a critical role in the control of severe HSV-1 encephalitis. *Neuroscience Letters.* 479: 58-62, 2010.
5. FROTA, E.R.C.; RODRIGUES, D.H.; DONADI, E.A.; BRUM, D.G.; MACIEL, D.R.K.; TEIXEIRA, A.L. Increased plasma levels of brain derived neurotrophic factor (BDNF) after multiple sclerosis relapse. *Neuroscience Letters.* 460: 130-132, 2009.
6. RODRIGUES, D.H.; SACHS, D.; TEIXEIRA, A.L. Mechanical hypernociception in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria.* 67: 78-81, 2009.
7. VILELA, M.C.; MANSUR, D.S.; LACERDA-QUEIROZ, N.; RODRIGUES, D.H.; LIMA, G.K.; ARANTES, R.M.E.; KROON, E.G.; CAMPOS, M.A.; TEIXEIRA, M.M.; TEIXEIRA, A.L. The Chemokine CCL5 Is Essential for Leukocyte Recruitment in a Model of Severe Encephalitis. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1153: 256-263, 2009.
8. HANDEL, T.M.; JOHNSON, Z.; RODRIGUES, D.H.; DOS SANTOS, A. C.; CIRILLO, R.; MUZIO, V.; RIVA, S.; MACK, M.; DERUAZ, M.; BORLAT, F.; VITTE, P.A.; WELLS, T.N.C.; TEIXEIRA, M.M.; PROUDFOOT, A.E.I. An engineered monomer of CCL2 has anti-inflammatory properties emphasizing the importance of oligomerization for chemokine activity in vivo. *Journal of Leukocyte Biology.* 84: 1101-1108, 2008.
9. DE PAULA, M.; RODRIGUES, D.H.; TEIXEIRA, H.C.; BARSANTE, M.M.; SOUZA, M.A.; FERREIRA, A.P. Genistein down-modulates pro-inflammatory cytokines and reverses clinical signs of experimental autoimmune encephalomyelitis. *International Immunopharmacology.* 8: 1291-1297, 2008.

10. RODRIGUES, D.H.; NETO, F.A.; SCHUSTER, I. Identification of essentially derived soybean cultivars using microsatellite markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. 8: 74-78, 2008.
11. COELHO, F.M.; PINHO, V.; AMARAL, F.A.; SACHS, D.; COSTA, V.V.; RODRIGUES, D.H.; VIEIRA, A.T.; SILVA, T.A.; SOUZA, D.G.; BERTINI, R.; TEIXEIRA, A.L.; TEIXEIRA, M.M. The chemokine receptors CXCR1/CXCR2 modulate antigen-induced arthritis by regulating adhesion of neutrophils to the synovial microvasculature. *Arthritis and Rheumatism*. 58: 2329-2337, 2008.
12. VILELA, M.C.; MANSUR, D.S.; LACERDA-QUEIROZ, N.; RODRIGUES, D.H., ARANTES, R.M.E.; KROON, E.G.; CAMPOS, M.A.; TEIXEIRA, M.M.; TEIXEIRA, A.L. Traffic of leukocytes in the central nervous system is associated with chemokine up-regulation in a severe model of herpes simplex encephalitis: An intravital microscopy study. *Neuroscience Letters*. 445: 18-22, 2008.
13. MIRANDA, A.S.; RODRIGUES, D.H.; VIEIRA, L.B.; LIMA, C.X.; RACHID, M.A.; VIDIGAL, P.V.T.; GOMEZ, M.V.; REIS, H.J.; GUATIMOSIM, C.; TEIXEIRA, A.L. A thioacetamide-induced hepatic encephalopathy model in C57Bl/6 mice: a behavioral and neurochemical study.. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*. No prelo. 2010.

9. Anexos

9.1. Anexo I – gráficos de avaliação clínica.

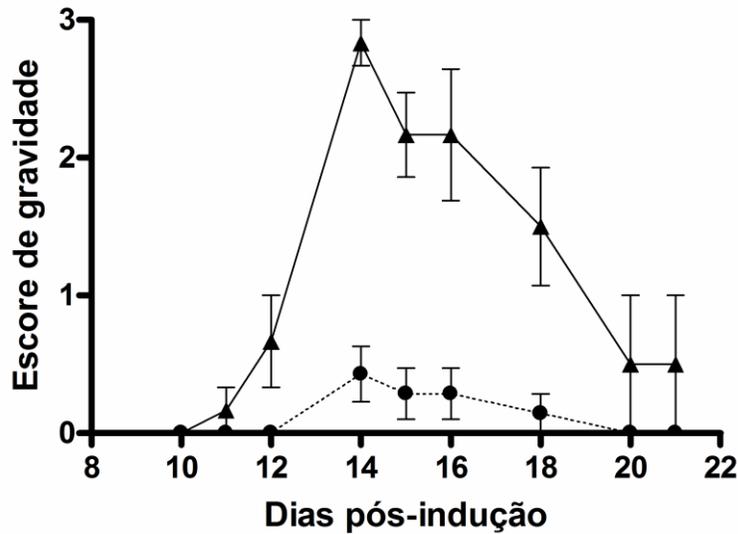


Gráfico 13 Desenvolvimento de sinais motores após indução de EAE em animais WT e PAFR^{-/-}. Animais WT EAE (▲) e PAFR^{-/-} EAE (●) foram induzidos com EAE e a debilidade motora foi monitorada diariamente utilizando o escore clínico mais simples padronizado para EAE. Animais PAFR^{-/-} (n=7) apresentaram escore clínico significativamente menor que os animais WT (n=6) ao longo de 19 dias de EAE (p=0.01).

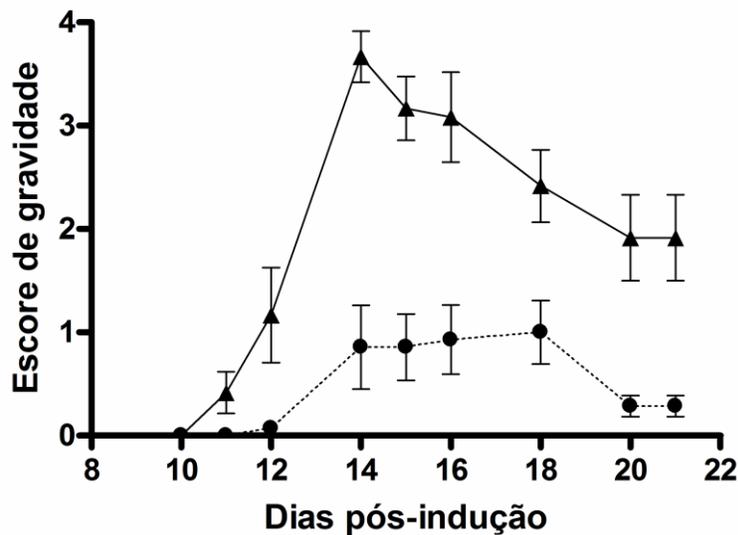


Gráfico 14 Desenvolvimento de sinais motores após indução de EAE em animais WT e PAFR^{-/-}. Animais WT EAE (▲) e PAFR^{-/-} EAE (●) foram induzidos com EAE e a debilidade motora foi monitorada diariamente utilizando o escore clínico segundo Guan e colaboradores (2006). Animais PAFR^{-/-} (n=7) apresentaram escore clínico significativamente menor que os animais WT (n=6) ao longo de 19 dias de EAE (p=0.01).

9.2. Anexo II - artigo científico publicado

BRAIN RESEARCH 1385 (2011) 298–306



available at www.sciencedirect.com



www.elsevier.com/locate/brainres

**BRAIN
RESEARCH**

Research Report

Absence of PAF receptor alters cellular infiltrate but not rolling and adhesion of leukocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis

David Henrique Rodrigues^{a,*}, Norinne Lacerda-Queiroz^a, Aline Silva de Miranda^a, Caio Tavares Fagundes^a, Roberta Dayrell de Lima Campos^a, Rosa Esteves Arantes^b, Márcia de Carvalho Vilela^a, Milene Alvarenga Rachid^c, Mauro Martins Teixeira^a, Antônio Lúcio Teixeira^a

^aLaboratory of Immunopharmacology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

^bLaboratory of Experimental Neuroimmune pathology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

^cLaboratory of Apoptosis, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 14 February 2011

Available online 19 February 2011

Keywords:

Experimental autoimmune encephalomyelitis
Platelet activating factor
Intravital microscopy
Chemokines

ABSTRACT

Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is a condition induced in some susceptible species to the study of multiple sclerosis (MS). The platelet activating factor (PAF) is an important mediator of immune responses and seems to be involved in MS. However, the participation of PAF in EAE and MS remains controversial. Thus, in this study, we aimed to evaluate the role of PAF receptor in the pathogenesis of EAE. EAE was induced using an emulsion containing MOG_{35–55}. EAE-induced PAF receptor knock out (PAFR^{-/-}) mice presented milder disease when compared to C57BL/6 wild type (WT) animals. PAFR^{-/-} animals had lower inflammatory infiltrates in central nervous system (CNS) tissue when compared to WT mice. However, intravital microscopy in cerebral microvasculature revealed similar levels of rolling and adhering leukocytes in both WT and PAFR^{-/-} mice. Interleukine (IL)-17 and chemokines C-C motif ligands (CCL)2 and CCL5 were significantly lower in PAFR^{-/-} mice when compared to WT mice. Brain infiltrating cluster of differentiation (CD)4⁺ leukocytes and IL-17⁺ leukocytes was diminished in PAFR^{-/-} when compared to WT mice. Taken together, our results suggest that PAF receptor is important in the induction and development of EAE, although it has no influence in rolling and adhesion steps of cell recruitment. The absence of PAF receptor results in milder disease by altering the type of inflammatory mediators and cells that are present in CNS tissue.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding author at: Laboratory of Immunopharmacology, sala 202, Instituto de Ciências Biológicas, Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG, Brazil. Fax: +5531(XX)3409 2545.

E-mail address: dhenrodrigues@gmail.com (D.H. Rodrigues).

Abbreviations: EAE, experimental autoimmune encephalomyelitis; MS, multiple sclerosis; PAF, platelet activating factor; PAFR^{-/-}, PAF receptor knock out; WT, wild type; CNS, central nervous system; IL, interleukin; CCL, C-C motif ligand; CD, cluster of differentiation; TNF- α , tumor necrosis factor alpha; Th, T-helper; MOG, myelin oligodendrocyte glycoprotein; CFA, Freund's complete adjuvant; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; NAG, N-acetyl- β -D-glucosaminidase; OD, optical density; MCP-1, monocyte chemoattractant protein 1; RANTES, regulated upon activation normal T-cell expressed, and secreted; RPMI, Roswell Park Memorial Institute; BSA, bovine serum albumin; FITC, fluorescein isothiocyanate; PE, phycoerythrin; SEM, standard error medium; ANOVA, analysis of variance

0006-8993/\$ – see front matter © 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

doi:10.1016/j.brainres.2011.02.036

1. Introduction

Multiple sclerosis is considered a classical T-cell-mediated autoimmune disease of the central nervous system (CNS), though its underlying causes remain obscure (McFarland and Martin, 2007). Most of the current knowledge on the mechanisms of CNS inflammation has been gathered from experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) which is considered an animal model of multiple sclerosis (Gold et al., 2006). Indeed, several researchers regard EAE as an important tool to explore mechanisms of autoimmunity and inflammation in CNS, ultimately contributing to provide insights for therapeutic strategies (Steinman and Zamvil, 2005; Ransohoff, 2006).

Many mediators are involved in CNS inflammation, such as chemokines, cytokines, Toll-like receptors. Among these, only a few works have investigated the role of platelet activating factor (PAF) in EAE. PAF is a potent and versatile mediator of inflammation that is produced by numerous cell types, especially by leukocytes (Stafforini et al., 2003; Ishii and Shimizu, 2000). PAF acts on a single receptor (PAFR) that may be expressed on the cellular membrane or the outer leaflet of the nucleus of various cell types, mainly leukocytes, platelets and endothelial cells (Ishii and Shimizu, 2000; Marrache et al., 2002).

Howat et al. (1989) were the first to propose a role for PAF in EAE. Blockade of PAF receptor with CV6209 led to decline in EAE severity (El Behi et al., 2007). In addition, enzymes involved in the production of PAF are upregulated in the CNS after EAE induction (Kihara et al., 2008). On the other hand, PCA4248 and WEB2170 antagonists of PAF were not able to suppress the clinical signs of EAE (Vela, 1991). Even though previous studies in EAE are not in complete agreement, PAF seems to act as a proinflammatory molecule. More recently, it was proposed that PAF plays a dual role in the course of EAE. In the induction phase, PAF would be involved in processes of blood-brain barrier breakdown and induction of the synthesis of inflammatory mediators. In the chronic phase, PAF would be contributing to prevent remission due to loss of phagocytic activity of microglia with the release of cytotoxic mediators such as tumor necrosis factor (TNF)- α (Kihara et al., 2005).

Thus, in this work, we aimed to investigate the role of PAF in the course of EAE using animals lacking the PAF receptor. We performed intravital microscopy, analysis of cytokines and chemokines in CNS and investigated cellular markers in brain tissue.

2. Results

2.1. Absence of PAF receptor attenuates EAE

WT animals developed EAE with onset of clinical signs after 11 days of immunization and a peak of motor impairment after 14 days of immunization. All WT mice developed signs of weakness and paralysis of both tail and hind limbs and there was a significant weight loss. In contrast, PAFR^{-/-} animals developed a milder disease, with significant lower clinical score ($p < 0.01$) and delayed onset when compared to WT mice

(Fig. 1A). PAFR^{-/-} animals also had a lower weight loss ($p < 0.001$) when compared to WT mice (Fig. 1B) and 2 out of 7 mice did not develop any clinical signs.

2.2. EAE-induced PAFR^{-/-} animals present distinct cellular infiltrates in CNS

We performed hematoxylin and eosin histopathology to evaluate changes in CNS tissue after EAE induction. EAE was induced in WT and PAFR^{-/-} mice and animals were sacrificed after 14 days of EAE induction (peak of clinical signs). Spinal cord from mice was removed and fixed in 10% buffered formalin. The histopathological aspect of spinal cord of WT and PAFR^{-/-} animals is shown in Fig. 2. In WT animals ($n = 4$) an inflammatory infiltrate composed predominantly of mononuclear cells (Fig. 2A and C) was observed. In PAFR^{-/-} animals ($n = 4$), there was a reduced area of inflammation (Fig. 2D) which presented mainly eosinophils and neutrophils (Fig. 2E and F). The infiltrated area was predominantly submeningeal and distributed along vessels that penetrate the spinal cord tissue. There was associated edema and vascular congestion of meninges in both WT and PAFR^{-/-} mice.

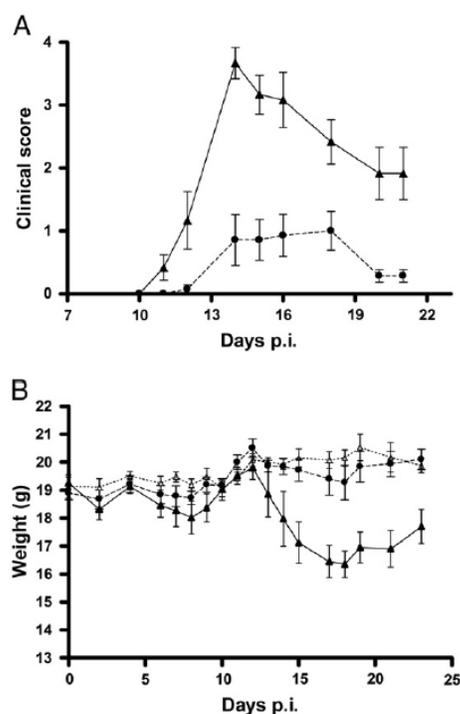


Fig. 1 – Clinical score (A) and weight (B) of groups WT ($n = 7$) and PAFR^{-/-} ($n = 7$) EAE-induced mice with MOG₃₅₋₅₅. (A) PAFR^{-/-} mice (●) present decreased clinical score when compared to WT mice (▲). (B) Weight of WT mice decreases significantly when compared to controls (Δ) and to PAFR^{-/-} mice. PAFR^{-/-} mice not induced with EAE were omitted in (B) for better visualization. Data are presented as mean of EAE score and error bars represent \pm SEM.

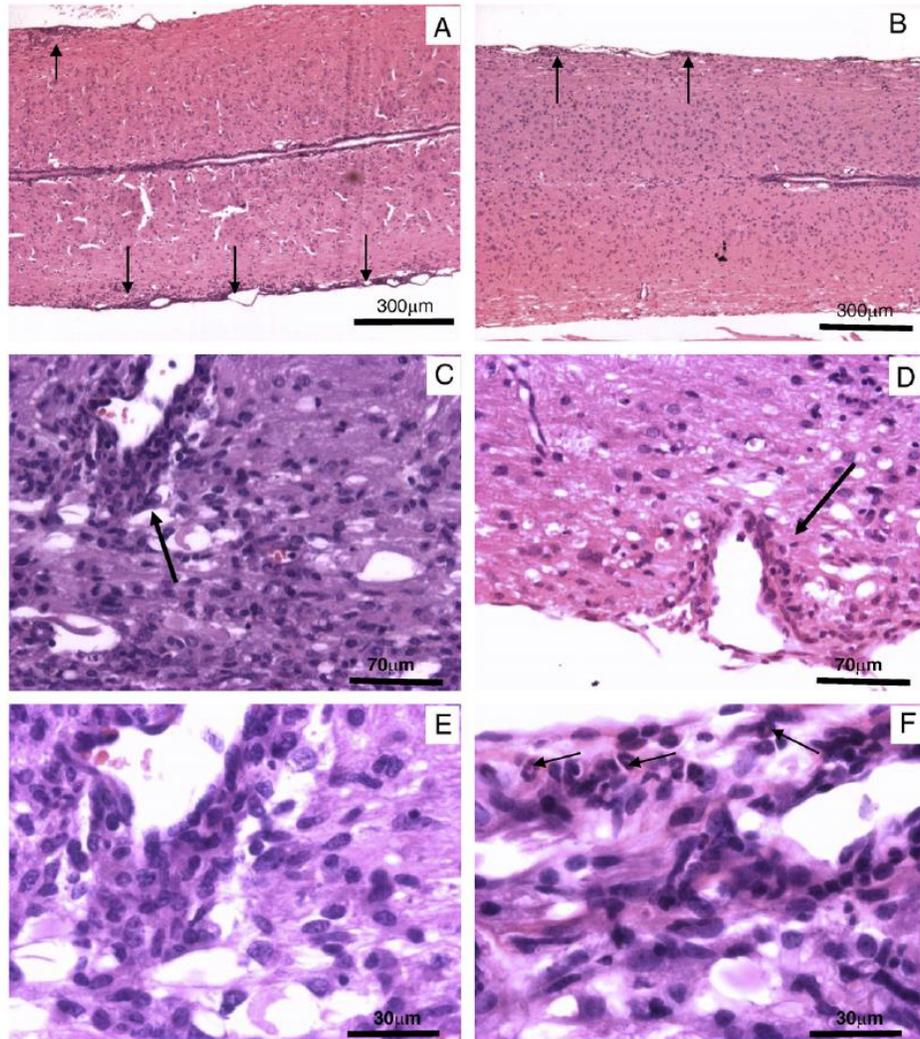


Fig. 2 – Histopathological aspects of spinal cord of WT (A, C and E) and PAFR^{-/-} (B, D and F). Mice were sacrificed at day 14 p.i. Panoramic view of longitudinal sections of spinal cord showing submeningeal increase of cellularity indicating inflammatory cell infiltration (arrows) in WT (A) and PAFR^{-/-} (B) animals. In C and D notice the perivascular infiltration of cells (arrows), edema and associated tissue damage. In E and F the aspect of mononuclear and polymorphonuclear inflammatory cells, mostly eosinophils (arrows).

We also removed brainstem tissue from the same animals to measure *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) activity, an index of macrophage sequestration. EAE-induced WT animals present increased NAG activity ($OD=3.27\pm 0.26$) when compared to controls (2.58 ± 0.07 ; $p<0.05$) and EAE-induced PAFR^{-/-} animals ($OD=2.26\pm 0.13$; $p<0.001$) (Fig. 3). There was no difference between EAE-induced PAFR^{-/-} and control PAFR^{-/-} mice.

2.3. Milder disease in PAFR^{-/-} is independent of rolling and adhesion of leukocytes in CNS microvasculature

To investigate whether PAFR^{-/-} mice presented altered rolling and adhesion of leukocytes in CNS microvasculature, we performed intravital microscopy in the cerebral microvascula-

ture on day 14 post immunization. EAE-induced WT mice presented elevated levels ($p<0.001$) of rolling (Fig. 4A; cells/min, mean \pm SE; 22.42 ± 3.31) and adhering (Fig. 4B; cells/100 μ m; 7.33 ± 0.83) cells when compared to control mice (rolling: 0.83 ± 0.29 ; adhering: 0.89 ± 0.32). PAFR^{-/-} mice also presented high levels ($p<0.001$) of rolling (15.54 ± 2.49) and adhering (7.44 ± 0.71) leukocytes, similar to their WT counterparts but higher than PAFR^{-/-} controls (rolling: 0.67 ± 0.14 ; adhering: 0.73 ± 0.12) (Fig. 4).

2.4. Inflammatory cytokines are not elevated in EAE-induced PAFR^{-/-} mice

We measured cytokines and chemokines known to be involved in EAE. Cytokine IL-17 (pg/100 mg of tissue; mean \pm SE; $175.60\pm$

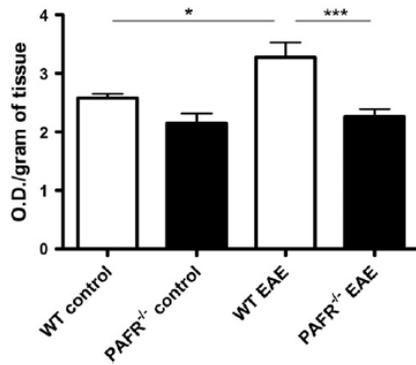


Fig. 3 – NAG activity in brain stem tissue from controls and EAE-induced mice. PAFR^{-/-} EAE-induced mice ($n=7$) presented significantly lower NAG levels when compared to WT EAE-induced mice ($n=5$). Results are expressed as mean \pm SEM, where * $p<0.05$ and *** $p<0.001$.

12.64) and chemokines CCL2 (128.40 ± 7.11) and CCL5 (882.40 ± 39.61) were elevated in EAE-induced WT mice after 14 days of immunization when compared to controls (IL-17: 117.40 ± 9.50 ; CCL2: 43.45 ± 4.37 ; CCL5: 479.40 ± 36.02 ; $p<0.05$) (Fig. 5) and PAFR^{-/-} mice after 14 days of EAE induction (IL-17: 146.50 ± 5.08 ; CCL2: 49.99 ± 1.65 ; CCL5: 590.70 ± 17.66 ; $p<0.05$). Also, there was no difference between EAE-induced PAFR^{-/-} mice and PAFR^{-/-} controls (IL-17: 157.00 ± 16.40 ; CCL2: 54.85 ± 3.79 ; CCL5: 632.90 ± 46.72).

2.5. CD4⁺ and IL-17-secreting cells are reduced in the brain of EAE-induced PAFR^{-/-} mice

We performed leukocytes isolation and staining to define which cells were infiltrating the CNS (Fig. 6). EAE-induced WT mice presented elevated levels of CD4⁺ stained cells (percentage of CD4⁺ staining; median <range>: $1.71 < 0.41-10.99 >$) when compared to PAFR^{-/-} ($0.20 < 0.12-0.28 >$) mice after 14 days of induction ($p<0.01$). There was also a higher staining of cells synthesizing IL-17 ($3.94 < 2.74-12.33 >$) in WT mice when compared to PAFR^{-/-} animals ($2.75 < 2.21-3.29 >$; $p<0.05$).

3. Discussion

In this work, we showed that the absence of PAF receptor attenuates EAE. This better clinical outcome was associated with lower levels of cytokines and reduced mononuclear cell infiltration in the CNS. Interestingly, there was a change in the profile of the inflammatory infiltrate composed mainly of neutrophils and eosinophils, while no alteration in pivotal steps (rolling and adhesion) of cell recruitment was noticed. Also, of great importance, T-helper (Th)17 response seems to be impaired in EAE-induced PAFR^{-/-} mice.

Induction of EAE results in hind limbs paresis and paralysis in WT mice following resolution of disease by recovery of clinical signs. Milder disease in animals lacking the PAF

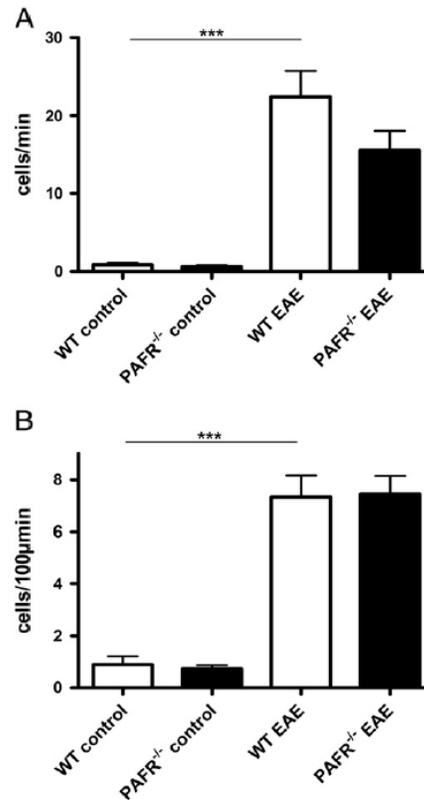


Fig. 4 – Visualization of leukocyte–endothelium interaction in the peak of EAE. Intravital microscopy was used to assess the rolling and adhesion of leukocytes in brain microvasculature. The protocol included control group (controls, WT=4, PAFR^{-/-}=4), WT EAE ($n=4$) and PAFR^{-/-} EAE ($n=9$) mice on day 14 post immunization. Data indicate a mean \pm SEM of cells per minutes (A) or cell/100 μm (B). Statistically significant differences were indicated by *** $p<0.001$.

receptor confirmed previous studies investigating PAF in EAE. Kihara et al. (2005) reported diminished disease incidence in PAFR^{-/-} mice and a better recovery of clinical signs. Clinical signs in EAE are elicited due to loss of myelin and axons in CNS tissue (Wujek, et al., 2002). Mononuclear cells infiltrating the CNS are thought to be the effectors of myelin and axon damage (Zeine and Owens, 1992). EAE-induced PAFR^{-/-} mice presented fewer mononuclear cells in spinal cords and reduced macrophage sequestration in brainstem when compared to WT animals, suggesting that absence of PAF receptor is impairing recruitment of these cells to CNS.

One possibility that could explain lower mononuclear cell infiltration could be diminished rolling and adhesion of these cells in CNS microvasculature. To evaluate rolling and adhesion steps of leukocyte recruitment, we performed intravital microscopy in cerebral microvasculature at the peak of EAE in WT animals. EAE-induced WT animals present increased levels of rolling and adhered leukocytes, as already

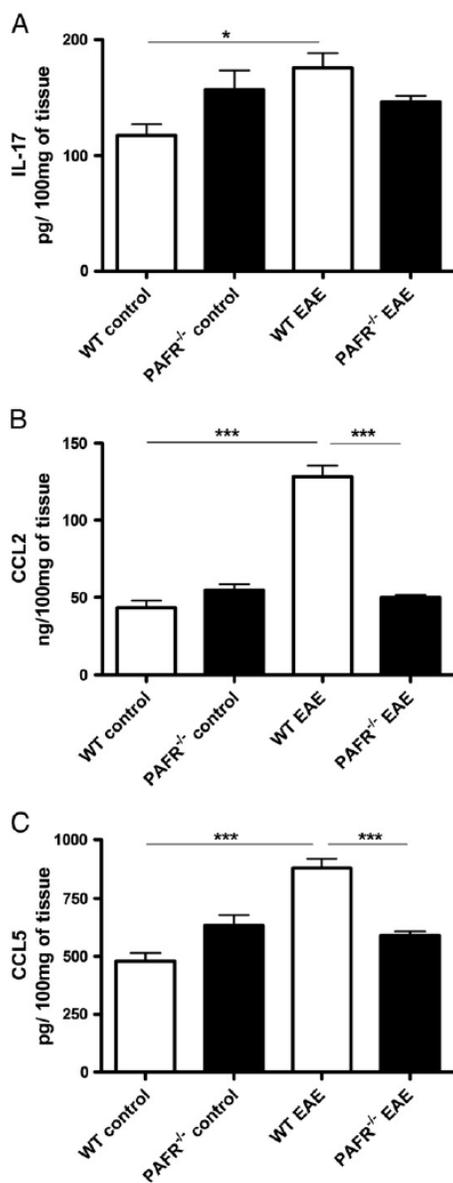


Fig. 5 – Kinetics of chemokine protein production in the CNS of EAE mice. Protein concentrations were measured in brain extracts by ELISA on day 14 after immunization with MOG_{35–55}. Assay was performed in EAE mice (WT = 6; PAFR^{-/-} = 7) and control group (WT = 4, PAFR^{-/-} = 5) for IL-17 (A), CCL2 (B) and CCL5 (C). Results were expressed as the mean ± SEM. Statistically significant differences were indicated by **p* < 0.05 and ****p* < 0.001.

assessed by previous work from our group (dos Santos et al., 2005; Rodrigues et al., 2010; Teixeira et al., 2010). Surprisingly, PAFR^{-/-} mice presented similar levels of leukocyte rolling and

adhesion when compared to WT mice. Rolling and adhesion are steps of recruitment which depend on the expression of selectins and adhesion molecules and are influenced by the presence of chemokines in tissue (Schenkel et al., 2004). Nonetheless, migration and survival of migrating cells in tissue parenchyma depend on many other molecules. Thus, it is possible that the PAF receptor may not be relevant for the expression of molecules responsible for rolling and adhesion. In this line, our results also suggest that although rolling and adhesion of leukocytes are crucial steps of cell recruitment, they are not sufficient to promote cell infiltration through the blood–brain barrier. Conversely, the high levels of neutrophils and eosinophils in CNS from PAFR^{-/-} mice could indicate that rolling and adhering leukocytes in these animals are neutrophils and eosinophils, whereas the majority of rolling and adhering cells in WT mice are from mononuclear lineage. Unfortunately, rhodamine stains all kinds of leukocytes, therefore it is not possible to state whether rolling and adhering leukocytes are mononuclear or polymorphonuclear cells.

The presence of neutrophils and eosinophils in CNS tissue from PAFR^{-/-} mice reveals a bias towards recruitment of polymorphonuclear leukocytes in these mice. Interestingly, Wu et al. (2010) found a high number of neutrophils during onset and peak of EAE, suggesting that neutrophils contribute to the aggravation of disease. Furthermore, Kang et al. (2010) found that CD4⁺ T cells recruited by astrocytes are essential for EAE onset. Therefore, we hypothesize that neutrophils in CNS from PAFR^{-/-} mice may need signals provided by mononuclear cells (CD4⁺ T cells) to promote tissue damage. Further studies are needed to define which signals may be influencing neutrophil-mediated tissue damage.

Infiltrating cells synthesize molecules to recruit and activate more cells to invade CNS tissue (Reboldi et al., 2009). It has been established that EAE-induced mice present elevated cytokines and chemokines levels in CNS tissue at the peak of EAE (Fife et al., 2001; Juedes et al., 2000; Ambrosini et al., 2003). We confirmed the presence of high levels of proinflammatory cytokines and chemokines in EAE-induced WT mice. However, PAFR^{-/-} mice presented levels compared to control mice in all cytokines and chemokines measured, suggesting that infiltrating cells in these mice were not synthesizing these molecules. Lack of PAF receptor may be impairing IL-17 release by astrocytes, which were shown to be the source of this cytokine in the onset of EAE clinical signs (Kang et al., 2010). In addition, lack of mononuclear cells in CNS tissue, which was shown by the diminished number of CD4⁺ lymphocytes, may result in lower cytokine and chemokine synthesis. Kihara et al. (2005) found a decreased phagocytic activity in PAFR^{-/-} macrophages. Our data suggest that the reduced amount of IL-17 and diminished number of CD4⁺ cells may account for the reduced phagocytic activity of macrophages lacking PAFR.

Th17 response has been shown to be relevant in EAE (Langrish et al., 2005). To our knowledge, we showed, for the first time, that this response may be impaired in EAE-induced PAFR^{-/-} mice. The need for Th17 responses to induce EAE is still a matter of debate. While some studies consider it to be essential (Kroenke and Segal, 2007), others claim that it is not necessary (Kroenke et al., 2010). We show here an

association of diminished EAE severity and impaired Th17 response.

4. Conclusions

In conclusion, we have shown that PAF receptor is important in the induction and development of EAE. Absence of this receptor leads to milder mononuclear cell infiltration, decrease of CD4⁺ Th17 lymphocytes and lower levels of inflammatory cytokines and chemokines in CNS tissue, but no influence on leukocyte rolling and adhesion.

5. Experimental procedures

5.1. Mice

Female C57BL/6 mice were obtained from Animal Care Facilities of Federal University of Minas Gerais (UFMG, Brazil), aged between 9 and 10 weeks. Female PAFR^{-/-} mice with the same age of C57BL/6 were a kind gift from professor Takao Shimizu (University of Tokyo) and were bred and maintained under SPF conditions at Instituto de Ciências Biológicas. The Animal Ethics Committee of UFMG approved all experimental procedures used (protocol number: 129/2006).

5.2. EAE induction and clinical assessment

EAE was induced using an emulsion containing myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG), Complete Freund's Adjuvant (CFA) and attenuated *Mycobacterium tuberculosis*. Pertussis toxin was injected separately and intraperitoneally. MOG peptide, sequence 35–55 (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK; Auspep) was obtained from NeoMPS (San Diego, USA). Pertussis toxin and CFA were purchased from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA). Attenuated *M. tuberculosis* H37 RA was purchased from Difco Laboratories (Sparks, MD, USA). Each animal received 100 μ L of the emulsion in the base of tail containing 100 μ g of MOG_{35–55}. Each animal received two i.p. doses of 300 ng of pertussis toxin in the day of the immunization and 48 h later.

Animals were monitored daily and clinical score was evaluated using a standard scoring system. Briefly, the score is characterized as follows: 0=no signs; 0.5=tail weakness; 1=tail paralysis; 2=hind limb weakness; 3=hind limb paralysis; 4=hind limb paralysis and front limb weakness. Animals were also weighed daily.

5.3. Histopathology

Spinal cords were quickly removed after intravital microscopy and preserved in 10% buffered formalin. The sections (4 μ m) were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and analyzed for CNS inflammation in an Olympus BX51 microscope.

5.4. Measurement of N-acetyl- β -D-glucosaminidase activity

The extent of macrophage sequestration was quantified indirectly by the measuring of N-acetyl- β -D-glucosaminidase

(NAG) activity in brain supernatants, as an index of monocyte influx (Lacerda-Queiroz et al., 2010). In brief, the brains of control and immunized animals (on day 14 post immunization) were removed, weighed and the tissue was homogenized in extraction solution (100 mg of tissue per mL), containing 0.4M NaCl, 0.05% Tween 20, 0.5% BSA, 0.1 mM phenyl methyl sulphonyl fluoride, 0.1 mM benzethonium chloride, 10 mM EDTA and 20 KIU aprotinin, using Ultra-Turrax. Brain homogenate was centrifuged at 3000 \times g for 10 min at 4 °C and the resultant pellet was resuspended in saline/Triton 0.1%. The NAG reaction was run at 37 °C for 10 min in a 96-well microplate following the addition of 100 μ L p-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), dissolved in citrate/phosphate buffer (0.1 M citric acid, 0.1 M Na₂HPO₄, pH 4.5) at a final concentration of 2.24 mM. The reaction was terminated by the addition of 100 μ L 0.2M glycine buffer (pH 10.6). NAG activity was assayed by measuring the change in absorbance (optical density [OD]) at 405nm in a spectrophotometer (Emax, Molecular Devices) and interpolated on a standard curve constructed with p-nitrophenol (0–500 nmol/ml) (Sigma-Aldrich). Results were expressed as change in O.D. per gram of tissue.

5.5. Intravital microscopy in mouse brain

Intravital microscopy of the mouse cerebromicrovasculature was performed at day 14 post immunization as previously described (Vilela et al., 2008). Briefly, mice were anesthetized by intraperitoneal injection of a mixture of 150 mg/kg ketamine and 10 mg/kg Xylazine and the tail vein was cannulated for administration of fluorescent dyes. A craniotomy was performed using a high-speed drill (Dremel, USA) and the dura mater was removed to expose the underlying pial vasculature. Throughout the experiment, the mouse was maintained at 37 °C with a heating pad (Fine Science Tools Inc., Canada) and the exposed brain was kept moist with an artificial cerebrospinal fluid buffer, an ionic composition in mmol/L: NaCl 132, KCl 2.95, CaCl₂ 1.71, MgCl₂ 0.64, NaHCO₃ 24.6, dextrose 3.71 and urea 6.7, pH 7.4, at 37 °C. To observe leukocyte/endothelium interactions, leukocytes were fluorescently labeled by intravenous administration of rhodamine 6G (0.5 mg/kg body weight) and observed using a microscope (Olympus B201, \times 20 objective lens, corresponding a 100 μ m of area) outfitted with a fluorescent light source (epi-illumination at 510–560 nm, using a 590 nm emission filter). A silicon-intensified camera (Optronics Engineering DEI-470) mounted on the microscope projected the image onto a monitor (Olympus). Rolling leukocytes were defined as white cells moving at a velocity less than that of erythrocytes cells. Leukocytes were considered adherent to the venular endothelium if they remained stationary for 30 s or longer.

5.6. Quantification of MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5 and IL-17 in CNS

Brain tissue extracts were obtained from control and experimental mice that were sacrificed at 14 days after immunization. Brains were removed after intravital microscopy, and left and right hemispheres were stored on ice. Thereafter, frozen hemispheres were homogenized in extraction solution

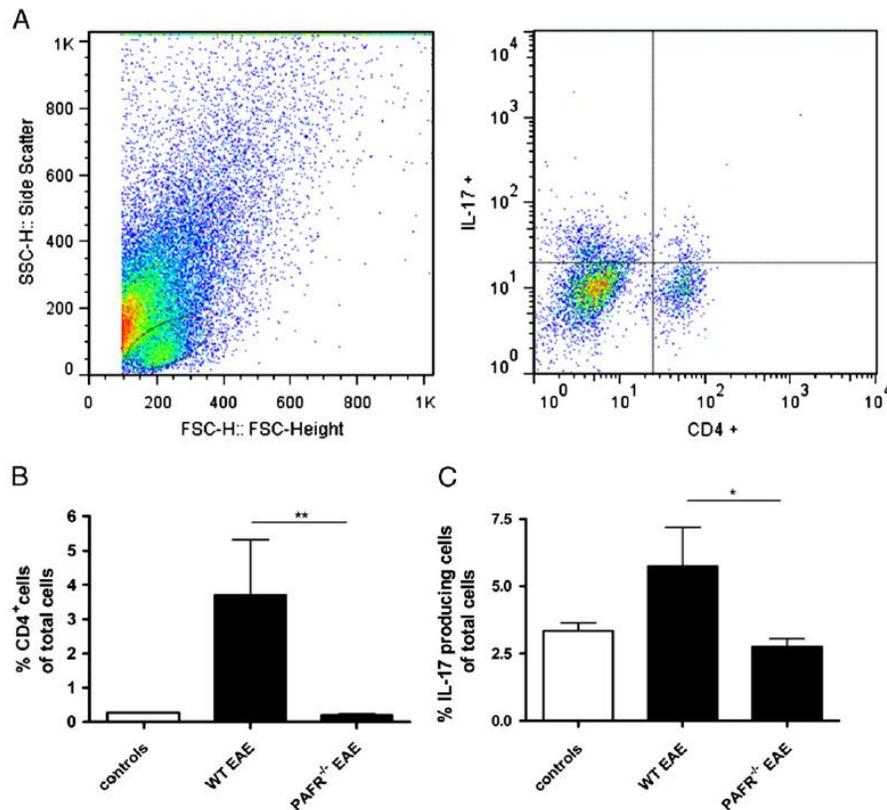


Fig. 6 – Flow cytometry analysis. Cells were obtained from brain tissue of animals (WT EAE=8; PAFR^{-/-} EAE=4) after 14 days of EAE induction. Gates for lymphocytes, CD4⁺ and IL-17 producing cells are shown (A). CD4⁺ cells were increased in WT EAE mice when compared to PAFR^{-/-} EAE (B). Cells synthesizing IL-17 were also increased in WT EAE mice when compared to PAFR^{-/-} EAE (C). Results were expressed as the mean ± SEM. Statistically significant differences were indicated by **p* < 0.05 and ***p* < 0.01.

(100 mg of tissue per 1 mL), containing 0.4 M NaCl, 0.05% Tween 20, 0.5% BSA, 0.1 mM Phenyl methyl sulphonyl fluoride, 0.1 mM benzethonium chloride, 10 mM EDTA and 20 KIU aprotinin, using Ultra-Turrax. Brain homogenate was spun at 12,500×*g* for 10 min at 4 °C and supernatants were collected and stored at -70 °C. The concentration of MCP-1/CCL2 (Monocyte Chemotactic Protein 1/Chemokine C-C motif Ligand 2), RANTES/CCL5 (Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted/Chemokine C-C motif Ligand 5) and IL-17 was determined using ELISA.

5.7. CNS-infiltrating leukocyte isolation and staining

After sacrifice, brain was removed from mice and leucocytes were then isolated from the brain by homogenization through a nitex screen into RPMI (Roswell Park Memorial Institute) media. This cell suspension was fractionated using a step gradient consisting of 30% percoll (Sigma, St. Louis, MO) diluted in RPMI layered over 75% percoll diluted in RPMI. After centrifugation (8000×*g*), myelin was aspirated off the

top of the 30% percoll layer. Leucocytes were removed from the interface between the 75% and 30% layers of percoll. Afterwards, leucocytes were centrifuged (600×*g*) and resuspended in 1 mL of a solution containing 0.5% Bovine Serum Albumin (BSA), 2 mM azide and phosphate-buffered saline (pH 7.4). Leucocytes obtained from CNS tissue were stained with a combination of fluoresceine isothiocyanate (FITC) and phycoerythrin (PE) labeled antibodies directed against surface molecule CD4 and intracellular molecule IL-17, respectively. Data were acquired using a FACScan (Becton Dickinson, San José, CA, USA) and raw data of FACS analysis were processed using the Cell Quest software (Becton Dickinson, San José, CA, USA). Collected flow cytometry data were analyzed using FlowJo software (Tree Star, Ashland, Oregon, USA) (Fig. 6).

5.8. Statistical analysis

Data are shown as mean ± SEM. ANOVA parametric test with Bonferroni correction was used for multiple comparisons. For

non-parametric data, we performed Mann–Whitney test. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgments

This work was funded by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), Brazil.

REFERENCES

- Ambrosini, E., Columba-Cabezas, S., Serafini, B., Muscella, A., Aloisi, F., 2003. Astrocytes are the major intracerebral source of macrophage inflammatory protein-3a/CCL20 in relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis and in vitro. *Glia* 41, 290–300.
- dos Santos, A.C., Barsante, M.M., Arantes, R.M., Bernard, C.C., Teixeira, M.M., Carvalho-Tavares, J., 2005. CCL2 and CCL5 mediate leukocyte adhesion in experimental autoimmune encephalomyelitis—an intravital microscopy study. *J. Neuroimmunol.* 162 (1–2), 122–129.
- El Behi, M., Zéphir, H., Lefranc, D., Dutoit, V., Dussart, P., Devos, P., Dessaint, J.P., Vermersch, P., Prin, L., 2007. Changes in self-reactive IgG antibody repertoire after treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis with anti-allergic drugs. *J. Neuroimmunol.* 182 (1–2), 80–88.
- Fife, B.T., Paniagua, M.C., Lukacs, N.M., Kunkel, S.L., Karpus, W.J., 2001. Selective CC chemokine receptor expression by central nervous system-infiltration encephalitogenic T cells during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neurosci. Res.* 66 (4), 705–714.
- Gold, R., Linington, C., Lassmann, H., 2006. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* 129, 1953–1971.
- Howat, D.W., Chand, N., Braquet, P., Willoughby, D.A., 1989. An investigation into the possible involvement of platelet activating factor in experimental allergic encephalomyelitis in rats. *Agents Actions* 27, 473–476.
- Ishii, S., Shimizu, T., 2000. Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice. *Prog. Lipid Res.* 39, 41–82.
- Juedes, A.E., Hjelmström, P., Bergman, C.M., Neild, A.L., Ruddle, N.H., 2000. Kinetics and cellular origin of cytokines in the central nervous system: insight into mechanisms of myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 164, 419–426.
- Kang, Z., Altuntas, C.Z., Gulen, M.F., Liu, C., Giltiy, N., Qin, H., Liu, L., Qian, W., Ransohoff, R.M., Bergmann, C., Stohlman, S., Tuohy, V.K., Li, X., 2010. Astrocyte-restricted ablation of interleukin-17-induced Act1-mediated signaling ameliorates autoimmune encephalomyelitis. *Immunity* 32 (3), 414–425.
- Kihara, Y., Ishii, S., Kita, Y., Toda, A., Shimada, A., Shimizu, T., 2005. Dual phase regulation of experimental allergic encephalomyelitis by platelet-activating factor. *J. Exp. Med.* 202 (6), 853–863.
- Kihara, Y., Yanagida, K., Masago, K., Kita, Y., Hishikawa, D., Shindou, H., Ishii, S., Shimizu, T., 2008. Platelet-activating factor production in the spinal cord of experimental allergic encephalomyelitis mice via the group IVA cytosolic phospholipase A2-lyso-PAFAT axis. *J. Immunol.* 181 (7), 5008–5014.
- Kroenke, M.A., Chensue, S.W., Segal, B.M., 2010. EAE mediated by a non-IFN- γ /non-IL-17 pathway. *Eur. J. Immunol.* 40 (8), 2340–2348.
- Kroenke, M.A., Segal, B.M., 2007. Th17 and Th1 responses directed against the immunizing epitope, as opposed to secondary epitopes, dominate the autoimmune repertoire during relapses of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neurosci. Res.* 85 (8), 1685–1693.
- Lacerda-Queiroz, N., Rodrigues, D.H., Vilela, M.C., Miranda, A.S., Amaral, D.C., Camargos, E.R., Carvalho, L.J., Howe, C.L., Teixeira, M.M., Teixeira, A.L., 2010. Inflammatory changes in the central nervous system are associated with behavioral impairment in *Plasmodium berghei* (strain ANKA)-infected mice. *Exp. Parasitol.* 125 (3), 271–278.
- Langrish, C.L., Chen, Y., Blumenschein, W.M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J.D., McClanahan, T., Kastelein, R.A., Cua, D.J., 2005. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.* 201 (2), 233–240.
- Marrache, A.M., Gobeil Jr., F., Bernier, S.G., Stankova, J., Rola-Pleszczynski, M., Choufani, S., Bkaily, G., Bourdeau, A., Sirois, M.G., Vazquez-Tello, A., Fan, L., Joyal, J.S., Filep, J.G., Varma, D.R., Ribeiro-Da-Silva, A., Chemtob, S., 2002. Proinflammatory gene induction by platelet-activating factor mediated via its cognate nuclear receptor. *J. Immunol.* 169, 6474–6481.
- McFarland, H.F., Martin, R., 2007. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat. Immunol.* 8 (9), 913–919.
- Ransohoff, R.M., 2006. EAE: pitfalls outweigh virtues of screening potential treatments for multiple sclerosis. *Trends Immunol.* 27 (4), 167–168.
- Reboldi, A., Coisne, C., Baumjohann, D., Benvenuto, F., Bottinelli, D., Lira, S., Uccelli, A., Lanzavecchia, A., Engelhardt, B., Sallusto, F., 2009. C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat. Immunol.* 10 (5), 514–523.
- Rodrigues, D.H., Vilela, M.C., Barcelos, L.S., Pinho, V., Teixeira, M.M., Teixeira, A.L., 2010. Absence of PI3K γ leads to increased leukocyte apoptosis and diminished severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 222 (1–2), 90–94.
- Schenkel, A.R., Mamdough, Z., Muller, W.A., 2004. Locomotion of monocytes on endothelium is a critical step during extravasation. *Nat. Immunol.* 5 (4), 393–400.
- Stafforini, D.M., McIntyre, T.M., Zimmerman, G.A., Prescott, S.M., 2003. Platelet-activating factor, a pleiotropic mediator of physiological and pathological processes. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 40, 643–672.
- Steinman, L., Zamvil, S.S., 2005. Virtues and pitfalls of EAE for the development of therapies for multiple sclerosis. *Trends Immunol.* 26, 565–571.
- Teixeira, M.M., Vilela, M.C., Soriani, F.M., Rodrigues, D.H., Teixeira, A.L., 2010. Using intravital microscopy to study the role of chemokines during infection and inflammation in the central nervous system. *J. Neuroimmunol.* 224 (1–2), 62–65.
- Vela, L., García Merino, A., Fernández-Gallardo, S., Vela, L., Sánchez Crespo, M., López Lozano, J.J., Saus, C., 1991. Platelet-activating factor antagonists do not protect against the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 33 (1), 81–86.
- Vilela, M.C., Mansur, D.S., Lacerda-Queiroz, N., Rodrigues, D.H., Arantes, R.M., Kroon, E.G., Campos, M.A., Teixeira, M.M., Teixeira, A.L., 2008. Traffic of leukocytes in the central nervous system is associated with chemokine up-regulation in a severe model of herpes simplex encephalitis: an intravital microscopy study. *Neurosci. Lett.* 445 (1), 18–22.

- Wu, F., Cao, W., Yang, Y., Liu, A., 2010. Extensive infiltration of neutrophils in the acute phase of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *Histochem. Cell Biol.* 133 (3), 313–322.
- Wujek, J.R., Bjartmar, C., Richer, E., Ransohoff, R.M., Yu, M., Tuohy, V.K., Trapp, B.D., 2002. Axon loss in the spinal cord determines permanent neurological disability in an animal model of multiple sclerosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 61 (1), 23–32.
- Zeine, R., Owens, T., 1992. Direct demonstration of the infiltration of murine central nervous system by Pgp-1/CD44^{high} CD45RB^{low} CD4⁺ T cells that induce experimental allergic encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 40 (1), 57–69.

9.3. Anexo III - Artigo aceito para publicação



David Henrique <dhenrodrigues@gmail.com>

[ANP] Decisão editorial

1 mensagem

Sistema SciELO de Publicação <suporte.aplicacao@scielo.org>

8 de julho de 2011 15:57

Responder a: Luis dos Ramos Machado <luisrmachado@globo.com>

Para: David Rodrigues <dhenrodrigues@gmail.com>

Cc: Márcia Carvalho Vilela <marciacvilela@gmail.com>, Norinne Lacerda-Queiroz <norinneq@yahoo.com.br>, Aline Silva Miranda <alines.miranda@hotmail.com>, Larissa Fonseca Cunha Sousa <laris.fonseca@gmail.com>, Helton José Reis <heltonjr@gmail.com>, Antônio Lúcio Teixeira <altexr@gmail.com>

David Rodrigues,

Foi tomada uma decisão sobre o artigo submetido à revista Arquivos de Neuro-Psiquiatria, "Behavioral investigation of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis".

A nossa decisão é aceitar o manuscrito.

Luis dos Ramos Machado

Fone 5511-32876600

Fax 5511-32898879

luisrmachado@globo.com

Dr. Luis dos Ramos Machado e Dr. José Antonio Livramento

Editores

Arquivos de Neuro-Psiquiatria

<http://submission.scielo.br/index.php/anp>

Behavioral investigation of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis

David Henrique Rodrigues, Márcia de Carvalho Vilela, Norinne Lacerda-Queiroz, Aline Silva de Miranda, Larissa Fonseca da Cunha Sousa, Helton José dos Reis, Antônio Lúcio Teixeira.

Laboratório de Imunofarmacologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

The authors declare no conflict of interest.

Financial support: CAPES, CNPq, FAPEMIG

David Henrique Rodrigues - Laboratório de Imunofarmacologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais - Avenida Antônio Carlos 6627 – 31270-901 Belo Horizonte MG - Brasil. E-mail: dhenrodrigues@gmail.com

Received 03 May 2011, received in final form 11 July 2011. Accepted 18 July 2011.

Abstract- Multiple sclerosis is a neuroinflammatory disease that results in serious neurological disability. Besides physical impairment, behavioral symptoms are also common in patients with multiple sclerosis. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is considered to be a model of multiple sclerosis and mimics the main features of the disease, such as demyelination and motor impairment. In this work, we aimed to study behavioral parameters in animals with EAE using the MOG₃₅₋₅₅ model in C57BL/6 mice. We analyzed memory and anxiety in animals using the elevated plus maze, the step down inhibitory avoidance task and the memory recognition test. No differences in any tests were found when comparing controls and animals induced with EAE. Therefore, we conclude that behavioral changes in animals with EAE induced with MOG₃₅₋₅₅ are probably subtle or absent.

Key words: multiple sclerosis, experimental autoimmune encephalomyelitis behavior, memory, anxiety.

Investigação comportamental de camundongos com encefalomielite autoimune experimental

Resumo- Esclerose múltipla é uma doença neuroinflamatória que resulta em séria incapacidade neurológica. Além do comprometimento físico, sintomas comportamentais também são comuns em pacientes com esclerose múltipla. A encefalomielite autoimune experimental (EAE) é considerada um modelo de esclerose múltipla e mimetiza as principais características da doença, como a desmielinização e a fraqueza motora. Neste trabalho, nós objetivamos estudar parâmetros comportamentais em animais com EAE usando o modelo de MOG₃₅₋₅₅ em camundongos C57BL/6. Nós analisamos memória e ansiedade em animais utilizando o labirinto em cruz elevado, o teste da esQUIVA inibitória e o teste de memória de reconhecimento. Nenhuma diferença em quaisquer dos testes foi encontrada quando comparando animais controles e animais induzidos com EAE. Assim, concluímos que alterações comportamentais em animais com EAE induzidos com MOG₃₅₋₅₅ são provavelmente sutis ou ausentes.

Palavras-Chave: esclerose múltipla, encefalomielite autoimune experimental comportamento, memória, ansiedade.

Multiple sclerosis (MS) is considered an autoimmune inflammatory disease and is one of the main causes of motor disability in young adults. Its defining pathological feature is the presence of central nervous system (CNS) demyelinating lesions in association with inflammatory infiltrates. Even though the main symptoms of MS are related to motor and sensory dysfunction, behavioral and cognitive changes have also been frequently reported. Among behavioral disorders, depression is the most frequent, affecting approximately 30% of MS patients¹. Many cognitive domains are impaired in MS, including attention, visuospatial abilities, memory, information processing speed and executive function^{2,3}.

To better understand the etiopathogenesis of MS, researchers use some experimental models and, among these, one of the most used is the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). Despite being traditionally related to motor dysfunction, in recent years some papers have reported behavioral changes in EAE. Pollak and collaborators⁴ named the expression EAE behavioral syndrome to refer to the behavioral changes that occur in SJL/J mice with EAE induced with proteolipid protein peptide (PLP₁₃₉₋₁₅₁). Pollak and collaborators found that EAE animals presented low social interaction and low sucrose consumption when compared to controls⁵.

Only a few works have studied behavioral changes after the reports of Pollak. In the present work, we sought to investigate behavioral changes in a model of EAE induced with MOG₃₅₋₅₅ in C57BL/6 mice.

METHOD

Mice

Seventy nine female C57BL/6 mice were obtained from Animal Care Facilities of the Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG, Brazil), aged between 9 and 10 weeks. The Animal Ethics Committee of UFMG approved all experimental procedures used (protocol number: 129/2006).

EAE induction and clinical assessment

EAE was induced using an emulsion containing myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG), Complete Freund's Adjuvant (CFA) and attenuated *Mycobacterium tuberculosis*. Pertussis toxin was injected separately and intraperitoneally. MOG peptide, sequence 35–55 (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK; Auspep) was obtained from NeoMPS (San Diego, USA). Pertussis toxin and CFA were purchased from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA). Attenuated *M. tuberculosis* H37 RA was purchased from Difco Laboratories (Sparks, MD, USA). Each animal received 100µL of the emulsion in the base of tail containing 100µg of MOG_{35–55}. Each animal received two i.p. doses of 300ng of pertussis toxin in the day of the immunization and 48 hours later.

Animals were monitored daily and clinical score was evaluated using a standardized scoring system⁶. Briefly, clinical signs were scored as follows: 0 = no signs; 0.5 = tail weakness; 1 = tail paralysis; 2 = hind limb weakness; 3 = hind limb paralysis; 4 = hind limb paralysis and front limb weakness. Animals were also weighed daily.

The elevated plus maze (EPM)

Anxiety-like behavior was evaluated on days 9 and 60 after EAE induction. The elevated plus maze (EPM) is a test of unconditioned anxiety-related behavior that involves a conflict between the rodent's desire to explore a novel environment and anxiogenic elements such as elevation and an unfamiliar open area⁷. This is a widely used test for anxiety behavior of rodents⁷⁻⁹. The EPM test was conducted as previously described¹⁰. Briefly, mice were placed in the center of the maze facing an open arm and were allowed to freely explore the EPM for 5 minutes. The animal placing all four paws onto the arm was considered to be in the arm, otherwise the animal was in the center of the maze. Behavior that was recorded when rodents were in the EPM included the time spent and entries made on the open and closed arms. The measures of anxiety were the percentage (%) of open arm entries and the percentage (%) of time spent on the open arms. The number of closed arm entries was considered as a locomotor activity measure. Decreased open arm activities indicate increased anxiety levels in EPM. Between each trial, the maze was wiped clean with a damp sponge and dried with paper

towels. Before behavioral assessment, animals were allowed to accommodate to their new environment for 2 days.

Inhibitory avoidance task

The inhibitory avoidance step down test was used as described previously¹¹. Briefly the apparatus was a 50×25×25cm acrylic box, whose floor consisted of parallel stainless-steel bars (1mm diam.) spaced 1cm apart. A 7cm wide×2.5cm high platform was placed on the floor of the box against the left wall. Animals were placed on the platform and their latency to step down on the grid with all four paws was measured with an automatic device. In training sessions, immediately after stepping down on the grid, the animals received a 2.0 seconds scrambled foot shock. The shock intensity was 0.4mA for animals given one training session. In test sessions performed 1 hour and 30 minutes and 24 hours after training session, no foot shock was administered and the step-down latency (maximum 180 seconds) was used as a measure of retention.

Object recognition task

The object recognition test was done as described elsewhere¹². This task is based on the spontaneous preference of rodents for novelty and their ability to remember previously encountered objects^{13,14}. The task assesses the ability of mice to discriminate between a novel and a familiar object¹⁵. Briefly, testing entailed placing mice in an arena (40cm long, 20cm high and 40cm wide) with two objects, with a familiarization session in the previous day. In the exploration day, the two objects are identical and mice are placed in the arena for 5 minutes. The time the animal spent exploring each object was recorded. Recognition memory was tested 1.5 hour and 1 day after the exploration phase. Mice were reintroduced into the arena and exposed to two objects, a familiar object and a novel object, whose positions were identical to the exploration session. The arena and the objects used were cleaned thoroughly between each mouse to ensure the absence of olfactory cues.

Statistical analysis

The Kolmogorov-Smirnov test was used to verify normality of samples. In samples with Gaussian distribution, we used parametric t-test. In samples without Gaussian distribution, we used non-parametric Mann-Whitney test. Statistical significance was defined as $p < 0.05$.

RESULTS

Development of EAE

EAE was induced and animals presented clinical signs beginning at day 11 after induction, with a peak of clinical signs after 17 days. Partial improvement of motor disabilities occurred between days 17 and 25. After 25 days, motor status did not change. Behavioral tests were performed in days 9 and 60 after induction.

No change in anxiety level in mice with EAE

After 9 days of EAE induction, one day before motor signs development, animals were evaluated in the EPM (Fig 1). No animals presented motor disability at this day. No differences in open arm exploration were detected ($p = 0.15$) between controls (percentage of total exploration, mean \pm SE: 18.67 ± 5.04) and mice with EAE (10.31 ± 3.13). After 60 days of EAE induction, animals were evaluated again. At this day, as some EAE mice still presented motor impairment, only animals with a score of up to 1 (tail weakness) were studied. No differences were detected ($p = 0.20$) between controls (22.59 ± 7.21) and animals with EAE (41.38 ± 12.08).

No change in memory in mice with EAE

The step-down inhibitory test was used at 9 days of induction, while the object recognition test was used after 60 days of induction to test memory. In the step down inhibitory test (Fig 2), no changes were found in the latency of step down 1h30min (median [range]; controls: 180.0 [77.0-180]; EAE: 180.0 [25.0-180.0]) and 24h (controls: 180.0 [178.0-180.0]; EAE: 180.0 [150.0-180.0]) after the training session (Fig 2A and 2B).

After 60 days of EAE induction, no significant changes were found in the exploration of the new objects by animals induced with EAE either 1h30min (in seconds; mean \pm SE; 53.80 \pm 4.30) or 24h (45.90 \pm 3.30) after the exposure to the first object ($p=0.17$), as it can be seen in Fig 3.

DISCUSSION

In the present work, we did not find clear behavioral changes in mice with EAE, either in the acute phase or after the remission of clinical signs.

The EAE model has some differences when compared to multiple sclerosis. In spite of the similar motor dysfunction, which involves weakness of limbs, in EAE, the CNS area affected is primarily the spinal cord. However, in recent years, some studies have detected evidence of inflammation and neuronal changes in the brain of mice with EAE^{16,17}. In previous works from our group, we have also found increased number of cells rolling and adhering in meningeal vessels and inflammatory infiltrate in the brain from EAE mice^{6,18}.

As a result of brain dysfunction, it could be expected that animals with EAE might present behavioral disturbances. Indeed, Pollak and collaborators⁵ reported sickness behavior in EAE, including symptoms of anorexia, reduced social exploration, and decreased preference for sucrose solution. It is worth mentioning that Pollak used an EAE model induced with proteolipid protein in SJL/J mice. Conversely, Levy and collaborators¹⁹, studying an EAE model similar to the current work, found no evidence of brain lesions in C57BL/6 mice. Furthermore, Brown and Sawchenko¹⁶ using C57BL/6 mice and the MOG₃₅₋₅₅ model found only minor T cell infiltration in CNS without neuronal degeneration before 10 days of induction and the areas compromised were the choroid plexus, the meninges (both in the brain and in the spinal cord), olfactory bulbs and the circumventricular organs. MacKenzie-Graham and collaborators²⁰ also found evidence of non-spinal lesions with important cerebellar gray matter cell death, especially Purkinje cells. However, none of the previous works found consistent evidence of brain inflammation and neurodegeneration before the onset of motor symptoms. It is possible that brain

inflammation is associated with behavioral changes only at the peak of the acute phase of EAE when motor signs are at maximum severity.

The possibility of behavioral changes coinciding with the most severe phase of EAE raises an important question. How is it possible to measure the supposed behavioral changes considering that all behavioral tests depend on motor function? For example, Jones and collaborators²¹ found differences in the open field test in the number of crossings of animals with EAE compared to controls. However, it is not possible to conclude whether this outcome is a result of motor impairment or it is a behavioral change. Peruga and collaborators²² solved this problem by using a model of mild EAE based on the reduction of the amount of pertussis toxin. While this is a good strategy to significantly attenuate the motor impairment, the mechanism that leads to the behavioral changes may be completely different.

It is also relevant to state that the low sensitivity of the elevated plus maze test may be responsible for the lack of detection of subtle changes in anxiety. Peruga and collaborators²² used the dark-light box to evaluate anxiety in animals with mild EAE, and they found an increase of anxiety in these animals. Therefore, the elevated plus maze may not be a sensitive model to study anxiety in EAE.

We also evaluated short term and long term episodic memory with the object recognition test and short term and long term aversive memory using the inhibitory avoidance task. Hippocampal lesions were reported in the brain of multiple sclerosis patients^{23,24} and also in animals with EAE^{17,25}. However, the presence of lesions in hippocampus is still a matter of debate since Brown and Sawchenko¹⁶ concluded that the hippocampus does not show neurodegeneration concurrent with T-cell infiltration and/or microglial activation. Thus, the lack of inflammation or neurodegeneration of limbic structures, as the hippocampus, may be the reason for the absence of memory impairment in our work. These results are in contradiction with data obtained by Ziehn and collaborators¹⁷ who found decreased volume of CA1, loss of inhibitory interneurons and increase in death of hippocampal glia and neurons. Even though both Ziehn and Brown used C57BL/6 mice and the MOG₃₅₋₅₅ to induce EAE, Ziehn used male mice, whereas Brown and Sawchenko used female mice. It is possible that lesions occur only during the most severe phase of EAE in female mice and, after remission, the area recovers. Another possibility is that,

by unknown reasons, the neuronal lesions in female mice are less severe than those present in male mice. Further studies are needed to address this point.

In this study, we could not detect significant behavioral symptoms in the EAE model. The inflammatory changes occurring in the brain were not sufficient to alter the behavior of EAE animals.

References

1. Chwastiak L, Ehde DM, Gibbons LE, Sullivan M, Bowen JD, Kraft GH. Depressive symptoms and severity of illness in multiple sclerosis: epidemiologic study of a large community sample. *Am J Psychiatry* 2002; 159: 1862-1868.
2. Engel C, Greim B, Zettl UK. Diagnostics of cognitive dysfunctions in multiple sclerosis. *J Neurol* 2007; 254(Suppl 2): S30-S34.
3. Ferreira ML. Cognitive deficits in multiple sclerosis: a systematic review. *Arq Neuropsiquiatr* 2010; 68: 632-641.
4. Pollak Y, Orion E, Goshen I, Ovadia H, Yirmiya R. Experimental autoimmune encephalomyelitis-associated behavioral syndrome as a model of 'depression due to multiple sclerosis'. *Brain Behav Immun* 2002; 16(5): 533-543.
5. Pollak Y, Ovadia H, Goshen I, et al. Behavioral aspects of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 2000; 104: 31-36.
6. Rodrigues DH, Vilela MC, Barcelos LS, Pinho V, Teixeira MM, Teixeira AL. Absence of PI3Kgamma leads to increased leukocyte apoptosis and diminished severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 2010; 222: 90-94.
7. Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse, *Psychopharmacology* 1987; 92: 180-185.
8. File SE. Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. *Behav Brain Res* 2001; 125: 151-157.
9. Miranda AS, Lacerda-Queiroz N, Vilela MC, et al. Anxiety-like behavior and proinflammatory cytokine levels in the brain of C57BL/6 mice infected with *Plasmodium berghei* (strain ANKA). *Neurosci Lett* 2011; 491: 202-206.

10. Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc* 2007; 2: 322-328.
11. Quevedo J, Vianna MR, Roesler R, de-Paris F, Izquierdo I, Rose SP. Two time windows of anisomycin-induced amnesia for inhibitory avoidance training in rats: protection from amnesia by pretraining but not pre-exposure to the task apparatus. *Learn Mem* 1999; 6: 600-607.
12. Goodman T, Trouche S, Massou I, et al. Young hippocampal neurons are critical for recent and remote spatial memory in adult mice. *Neuroscience* 2010; 171: 769-778.
13. Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res* 1988; 31: 47-59.
14. Dodart JC, Mathis C, Ungerer A. Scopolamine-induced deficits in a two-trial object recognition task in mice. *Neuroreport* 1997; 8: 1173-1178.
15. Winters BD, Forwood SE, Cowell RA, Saksida LM, Bussey TJ. Double dissociation between the effects of peri-postrhinal cortex and hippocampal lesions on tests of object recognition and spatial memory: heterogeneity of function within the temporal lobe. *J Neurosci* 2004; 24: 5901-5908.
16. Brown DA, Sawchenko PE. Time course and distribution of inflammatory and neurodegenerative events suggest structural bases for the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Comp Neurol* 2007; 502: 236-260.
17. Ziehn MO, Avedisian AA, Tiwari-Woodruff S, Voskuhl RR. Hippocampal CA1 atrophy and synaptic loss during experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE. *Lab Invest* 2010; 90: 774-786.
18. Rodrigues DH, Lacerda-Queiroz N, Miranda AS, et al. Absence of PAF receptor alters cellular infiltrate but not rolling and adhesion of leukocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Res* 2011;1385:298-306.
19. Levy H, Assaf Y, Frenkel D. Characterization of brain lesions in a mouse model of progressive multiple sclerosis. *Exp Neurol*. 2010; 226: 148-158.
20. MacKenzie-Graham A, Tiwari-Woodruff SK, Sharma G, et al. Purkinje cell loss in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuroimage* 2009; 48: 637-651.

21. Jones MV, Nguyen TT, Deboy CA, et al. Behavioral and pathological outcomes in MOG 35-55 experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 2008; 199: 83-93.
22. Peruga I, Hartwig S, Thöne J, et al. Inflammation modulates anxiety in an animal model of multiple sclerosis. *Behav Brain Res* 2011;220:20-29.
23. Calabrese M, Rocca MA, Atzori M, et al. A 3-year magnetic resonance imaging study of cortical lesions in relapse-onset multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2010; 67: 376-383.
24. Sicotte NL, Kern KC, Giesser BS, et al. Regional hippocampal atrophy in multiple sclerosis. *Brain* 2008; 131: 1134-1141.
25. Pomeroy IM, Jordan EK, Frank JA, Matthews PM, Esiri MM. Focal and diffuse cortical degenerative changes in a marmoset model of multiple sclerosis. *Mult Scler* 2010; 16: 537-548.

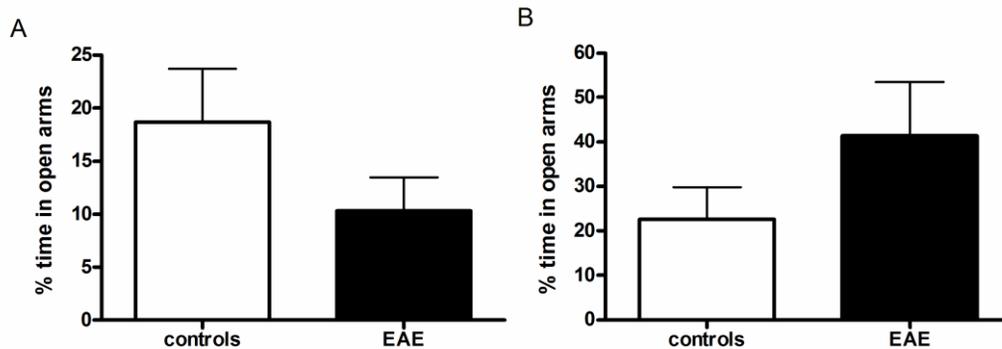


Fig 1 Percentage of time spent in open arms in the elevated plus maze. Animals with EAE after 9 (A, n=15) and 60 days of induction (B, n=8) were tested. No differences were found between EAE induced animals and controls (n=10). EAE: experimental autoimmune encephalomyelitis.

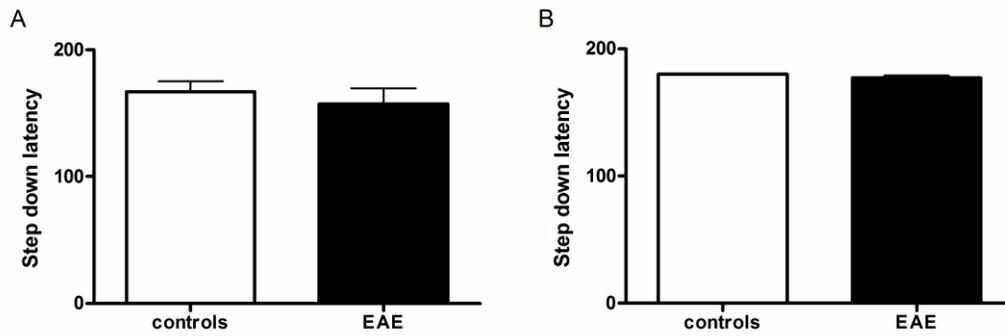


Fig 2 Step down latency in the Step Down Inhibitory Avoidance task. At 9 days of induction, animals with EAE (n=15) had similar step down latency when compared to non-induced EAE mice (n=15) 1h30min (A) and 24h (B) after receiving aversive stimulus. EAE: experimental autoimmune encephalomyelitis.

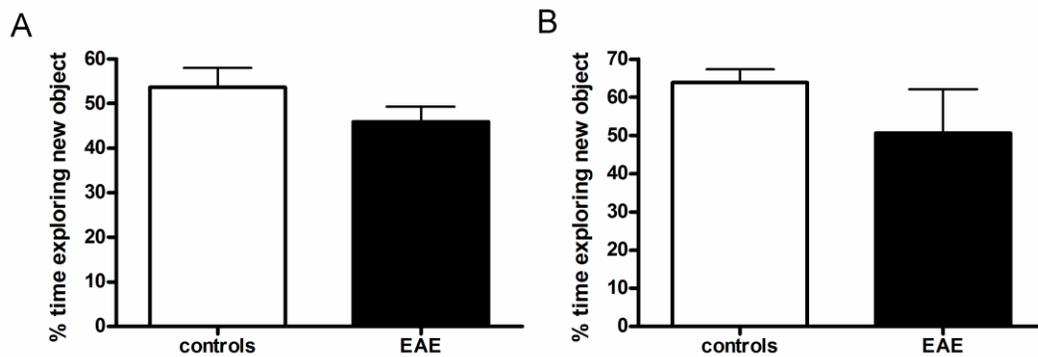


Fig 3 Percentage of time exploring new object in the object recognition test. At 60 days of induction, animals with EAE (n=8) presented similar exploration of the new object when compared to controls (n=8). Animals were evaluated for short term (A) and long term (B) memory. EAE: experimental autoimmune encephalomyelitis.