

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

ADRIANA HELENA DO NASCIMENTO ELIAS

**NEURITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL
EM CAMUNDONGOS C57BL/6**

Ribeirão Preto
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ADRIANA HELENA DO NASCIMENTO ELIAS

NEURITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL
EM CAMUNDONGOS C57BL/6

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

Área de concentração: Neurologia
Opção: Neurociência

Orientador: Prof. Dr. Amilton Antunes Barreira

Ribeirão Preto
2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Nascimento-Elias, Adriana Helena

Neurite autoimune experimental em camundongos C57Bl/6.
Ribeirão Preto, 2009.

70 p. : il. ; 30cm

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

Orientador: Barreira, Amilton Antunes

1. Neurite autoimune experimental (NAE)
2. Camundongo C57Bl/6
3. Peptídeo da proteína P0.

Ao meu marido Pablo e a minha filha Beatriz pelo apoio incondicional e incessante durante a busca e realização dos meus sonhos, pelo carinho e amor diários que nos une e nos dá cada vez mais força para enfrentarmos os desafios e dificuldades da vida.

AGRADECIMENTOS

À minha família, meu marido Pablo e minha filha Beatriz, pelo apoio, incentivo e compreensão em todos os momentos dessa caminhada. Amo vocês!

Ao Prof. Amilton Antunes Barreira pela oportunidade, ensinamentos, apoio e confiança desde a iniciação científica até a realização deste trabalho.

Aos meus pais, Edna e Olívio, pelo ajuda incansável e pelas lições de vida que certamente contribuíram para todas as minhas realizações.

Aos meus irmãos Tábatha, Olívio e Osmar que acompanharam todo meu trajeto sempre ajudando e incentivando o quanto possível.

Aos meus sogros Elizabeth e Wagner pelo carinho, incentivo e prontidão em ajudar em todo momento.

À Thaís e Rodrigo pelo apoio fundamental nessa reta final.

Aos amigos do laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental:

Maria Cristina por todo o suporte técnico, mas principalmente pela amizade e confiança que cultivamos ao longo desses anos e certamente para sempre;

Aracy pela disposição em me ajudar, paciência e carinho que me confortaram todos esses anos. Obrigada pela amizade linda que confirmamos a cada dia;

Renato Meireles pelo apoio e auxílio em todos os momentos, notavelmente naqueles em que houve problemas a resolver;

Ângela pela atenção, apoio e incentivo que contribuíram para passagem dos obstáculos;

Gabriela pelo incentivo e amizade nessa etapa tão importante;

Silvia e Sandra pelo carinho e torcida sempre.

Às amigas eternas Rafaela, Jaqueline, Débora, Lígia, Priscila e Karina que presentes ou não estarão em todos os momentos da minha vida.

Finalmente, a Deus por me conduzir por mais esta etapa com fé e esperança. Sei que não basta simplesmente existir, devemos ter um ideal pelo qual lutar e nunca estaremos sozinhos.

A todos muito obrigada!

"São grandes as recompensas para aqueles que optam pelos caminhos duros e difíceis, mas recompensas acham-se ocultas pelos anos. Toda escolha é feita inteiramente às cegas, e o mundo não nos dá garantia alguma. O bom caráter advém de seguirmos nosso supremo senso de retidão, de confiarmos nos ideais sem sequer estarmos certos de que darão certo".

Richard Bach

RESUMO

NASCIMENTO-ELIAS, A. H. **Neurite autoimune experimental em camundongos C57Bl/6**. 2009. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

A Neurite autoimune experimental (NAE), também chamada de neurite alérgica experimental, é uma doença inflamatória, monofásica e desmielinizante que afeta o sistema nervoso periférico, conhecida como modelo experimental da síndrome de Guillain-Barré. Pode ser induzida em animais susceptíveis através da imunização com vários antígenos do nervo periférico associados a adjuvantes. Modelos de NAE em ratos são bastante reprodutíveis e dos pontos de vista clínico, eletrofisiológico e histológico, comprometem os animais com mais intensidade. Entretanto, estudos em camundongos são importantes, em particular no C57Bl/6, uma vez que se trata de uma linhagem “background” para transgênicos e “knockouts”, o que facilita o estudo da patogenia das doenças induzidas experimentalmente. Os objetivos do estudo foram investigar a evolução da NAE em camundongos C57Bl/6, caracterizando seus sinais clínicos e histológicos, comparando as formas de aplicação da toxina pertussis (TP) e as doses do peptídeo utilizadas. Sessenta camundongos C57Bl/6, machos, com idade entre 6 e 8 semanas, pesando de 18 a 20g foram imunizados com o peptídeo neuritogênico P0₁₈₀₋₁₉₉ da mielina de nervo periférico bovino. Realizada imunização através de 2 injeções subcutâneas nas patas posteriores no dorso (base da cauda), respectivamente nos dias 0 e 7º pós-imunização (p.i.), contendo 100µl de emulsão, distribuídos equitativamente nas patas. As injeções de TP foram realizadas nos dias -1 (400ng), 0, 1 e 3 (200ng) p.i. Os animais foram divididos em 5 grupos: 1A - 200µg de P0₁₈₀₋₁₉₉ + TP i.v. (n=16); 1B - 200µg de P0₁₈₀₋₁₉₉ + TP i.p. (n=16); 2A - 60µg de P0₁₈₀₋₁₉₉ + TP i.v. (n=8); 2B - 60µg de P0₁₈₀₋₁₉₉ + TP i.p. (n=8) e grupo3 - 60µg de P0₁₈₀₋₁₉₉ + TP i.p. + KM⁺ (n=12). Os controles pareados receberam injeções de PBS + Adjuvante de Freund completo. Foram realizadas avaliações clínicas diárias até o 40º dia p.i. Para análise histológica foram retiradas amostras do nervo isquiático e de raízes nervosa de L3-L6. O teste de Kruskal Wallis e o post hoc de Dunn foram utilizados para comparação dos 5 grupos. Resultados: 90 % dos camundongos apresentaram algum sinal clínico-neurológico, 57% evoluíram para queda da cauda; 11% das amostras apresentaram células inflamatórias no endoneuro, epineuro ou perineuro. Dessas 8% epineurais ou perineurais e 5% endoneurais. Comparando as formas de aplicação da TP i.p. à i.v. e as doses de peptídeos utilizadas, doses de 200µg de peptídeos se associaram a sinais clínicos e comprometimento histológico mais evidentes do que nos outros grupos. O modelo da NAE desencadeado nos camundongos C57Bl/6 caracterizou-se por discretos sinais clínicos e pouquíssimas alterações histopatológicas. A correlação entre a evolução clínica da NAE e a presença de alterações histológicas nos nervos periféricos foi observada em número reduzido de animais. Trata-se de um modelo de difícil obtenção associado a discretas alterações. Estudos futuros, utilizando métodos que complementem a investigação como imuno-histoquímica e eletroneurofisiologia seriam importantes para confirmação e melhor descrição do desencadeamento e evolução da doença.

Palavras-Chave: Neurite autoimune experimental (NAE); Camundongo C57Bl/6; Peptídeo da proteína P0.

ABSTRACT

NASCIMENTO-ELIAS, A. H. **Experimental autoimmune neuritis in C57Bl/6 mice.** 2009. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Experimental autoimmune neuritis (EAN) is an animal model of the Guillain-Barré syndrome in human, a demyelinating autoimmune disease of the peripheral nervous system (PNS). EAN can be induced in susceptible animals, such as Lewis rat, by immunization with peripheral nerve myelin or its components P2 or P0 proteins emulsified in Freund's complete adjuvant (CFA). Establishing EAN in mice especially in the reputedly resistant C57Bl/6 strain is important for investigating the pathogenic mechanism of EAN, because it enables the use congenic, recombinant strain and it permits genetic analysis and studies of transgenic and knockout animals. In the present study, we sought to determine the clinical and histopathology characteristics EAN in C57Bl/6 mice induced by the immunodominant P0 glycoprotein peptide 180-199. Sixty C57Bl/6 mice, male, 6-8 weeks old, with body weights of 18-10g were immunized two times (days 0 and 7 post immunization, p.i.). Each mouse received subcutaneous injections both footpads with altogether 100µl. The mice received additionally pertussis toxin (TP) on day -1 (400ng), 0, 1 e 3 (200ng) p.i. Five groups were determined: 1A - 200µg de P0₁₈₀₋₁₉₉ + TP i.v. (n=16); 1B - 200µg de P0₁₈₀₋₁₉₉ + TP i.p. (n=16); 2A - 60µg de P0₁₈₀₋₁₉₉ + TP i.v. (n=8); 2B - 60µg de P0₁₈₀₋₁₉₉ + TP i.p. (n=8) e group 3 - 60µg de P0₁₈₀₋₁₉₉ + TP i.p. + KM⁺ (n=12). A control group received PBS in CFA. The mice were observed for clinical disease until day 40 p.i. Segments of sciatic nerves and lumbar spinal cord L3-L6 were dissected and fixed in 3% glutaraldehyde. The Kruskal Wallis test and Dunn' post hoc were employed for analyzing clinical course; P values ≤ 0,05 were considered significant. Results: 90% of mice exhibited some clinical signs, 57% showed limb tail; 11% of the sections examined revealed cell mononuclear in endoneurium, epineurium or perineurium. Comparing the forms of application TP i.v. X i.p. and the doses of peptides used, differences favoring the larger doses of the peptide between groups. No significant difference in clinical signs between the 5 groups. The model of EAN induced in C57Bl/6 mice of difficult to obtain and was characterized by discrete clinical signs and few histological changes.

Key words: C57Bl/6 mice; experimental autoimmune neuritis (EAN); P0 protein peptide

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1-	Fragmento do nervo isquiático no 20º dia p.i. Grupo 1A	40
FIGURA 2.I-	Fragmento da raiz nervosa no 24º dia p.i. Grupo 1A	40
FIGURA 2.II-	Corte semifino nervo isquiático no 28º dia p.i. Grupo 1A	40
FIGURA 3.I-	Corte semifino do nervo isquiático no 40º dia p.i. Grupo 1A	41
FIGURA 3.II-	Área endoneural ampliada de corte semifino do nervo isquiático no 40º dia p.i. Grupo 1A	41
FIGURA 4.I-	Secção longitudinal da raiz nervosa no 18º dia p.i. Grupo 1B	41
FIGURA 4.II-	Corte longitudinal do nervo isquiático no 20º dia p.i. Grupo 1B	41
FIGURA 5-	Fragmento do nervo isquiático no 24º dia p.i. Grupo 1B	42
FIGURA 6.I-	Corte longitudinal do nervo isquiático no 18º dia p.i. Grupo 2B	44
FIGURA 6.II-	Corte longitudinal do nervo isquiático no 20º dia p.i. Grupo 2A	44
FIGURA 7-	Secção transversal da raiz nervosa no 24º dia p.i. Grupo 2B	44
FIGURA 8.I-	Corte semifino, longitudinal de raiz nervosa no 40º dia p.i. Grupo 2B	45
FIGURA 8.II-	Secção transversal de raiz nervosa no 32º dia p.i. Grupo 2B	45
FIGURA 9.I-	Nervo isquiático no 24º dia p.i. Grupo 3	47
FIGURA 9.II-	Área endoneural do nervo isquiático no 24º dia p.i. Grupo 3	47
FIGURA 10.I-	Fragmento do nervo isquiático no 32º dia p.i. Grupo 3.....	48
FIGURA 10.II-	Área endoneural do nervo isquiático no 32º dia p.i. Grupo 3	48
FIGURA 10.III-	Fragmento do nervo isquiático no 28º dia p.i. Grupo 3	48
FIGURA 10.IV-	Área endoneural do nervo isquiático no 28º dia p.i. Grupo 3	48

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1-	Evolução dos sinais clínicos nos grupos 1A e 1B	39
GRÁFICO 2-	Evolução dos sinais clínicos nos grupos 2A e 2B	43
GRÁFICO 3-	Evolução dos sinais clínicos no grupo 3	46

LISTA DE TABELAS

TABELA 1-	Escala de avaliação clínica da NAE	35
TABELA 2-	Sinais clínicos na evolução da NAE nos grupos 1A e 1B.....	38
TABELA 3-	Sinais clínicos na evolução da NAE nos grupos 2A e 2B	43
TABELA 4-	Médias dos sinais clínicos da NAE nos 5 grupos	50

LISTA DE ABREVIATURAS

AFC	Adjuvante de Freund Completo
APC	Células Apresentadoras de Antígeno
CTLA-4	Linfócitos T Citotóxicos, Associados à Molécula-4
EAE	Encefalite Autoimune Experimental
iNOS	Isoforma induzível da Sintase do Óxido Nítrico
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MHC II	Moléculas de classe II do Complexo de Histocompatibilidade
MNP	Mielina do Nervo Periférico
MNPB	Mielina de Nervo Periférico Bovino
NAE	Neurite Autoimune Experimental
NO	Óxido Nítrico
p.i.	pós imunização
SGB	Síndrome de Guillain-Barré
SNP	Sistema Nervoso Periférico
TP	Toxina Pertussis

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Susceptibilidade e indução da NAE	17
1.2. Patogênese da NAE	20
1.2.1. <i>INF- γ na NAE</i>	22
1.2.2. <i>TNF-α na NAE</i>	22
1.2.3. <i>IL-12 na NAE</i>	24
1.2.4. <i>IL-2 e IL-6 na NAE</i>	24
1.2.5. <i>IL-18 e IL-17 na NAE</i>	25
1.2.6. <i>Papel dos macrófagos na NAE</i>	26
1.3. Aspectos clínicos e patológicos da NAE	27
1.4. Toxina Pertussis na indução da NAE	27
1.5. KM^+ (Artim M) na indução da NAE	28
2. OBJETIVOS	30
2.1. Geral	30
2.2. Específicos	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 Animais	32
3.2 Antígeno	32
3.3. Indução da NAE	32
3.4. Avaliação clínica da NAE	35
3.5. Avaliação Histológica	35
3.6. Análise estatística	36

4. RESULTADOS	38
4.1. Grupos 1A e 1B	38
4.1.1. <i>Evolução Clínica</i>	38
4.1.2. <i>Aspectos histológicos</i>	39
4.2. Grupos 2A e 2B	42
4.2.1. <i>Evolução clínica</i>	42
4.2.2. <i>Aspectos histológicos</i>	43
4.3. Grupo 3	45
4.3.1. <i>Evolução clínica</i>	45
4.3.2. <i>Aspectos histológicos</i>	46
4.4. Comparação entre os grupos	49
5. DISCUSSÃO	52
6. CONCLUSÕES	58
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A Neurite alérgica experimental (NAE), também chamada de neurite autoimune experimental, é uma doença inflamatória, monofásica e desmielinizante que afeta o sistema nervoso periférico (SNP) (WAKSMAN e ADAMS, 1955). Pode ser induzida em animais susceptíveis através da imunização com vários antígenos do nervo periférico associados a adjuvantes (GOLD R, HARTUNG HP, TOYKA KV, 2000). A patogenia da NAE inclui a quebra da barreira sangue-nervo, seguida de infiltrado inflamatório nas raízes nervosas e nervos periféricos e de desmielinização focal, principalmente nas raízes e em torno das vênulas (HARTUNG et al., 1996). Envolve também a ação de linfócitos T e B, e macrófagos, incluída a liberação de fatores inflamatórios (ZHU, J. et al. 1994, 1998a; HARTUNG et al., 1996). A NAE é amplamente utilizada como modelo experimental da síndrome de Guillain-Barré (SGB) por se assemelhar a essa síndrome em vários aspectos: histopatológicos, imunológicos e eletrofisiológicos (HAHN et al., 1996). A primeira tentativa bem sucedida de indução da NAE foi realizada em coelhos após injeção de mielina do nervo periférico (MNP), associada a adjuvante de Freund completo (AFC). Posteriormente, pôde ser verificado que o camundongo Suíço e cobaias imunizados com MNP também são susceptíveis (WAKSMAN e ADAMS, 1955, 1956). A imunização de animais susceptíveis pode também ser realizada com proteínas do nervo periférico, P2 (KADLUBOWSKI e HUGHES, 1979) e P0 (MILNER et al., 1987), ou ainda peptídeos sintéticos dessas proteínas, em particular a sequência de aminoácidos 57 – 81 ou 53 – 78 de P2 (OLEE et al., 1988, 1990) e 180 – 199 ou 106-125 de P0 (ZOU et al., 2000; MILETIC et al., 2005). Há modelos de NAE que, dos pontos de vista clínico, eletrofisiológico e histológico, são bastante reprodutíveis e comprometem os animais com mais intensidade. Desses, o modelo no rato Lewis é o mais utilizado. Entretanto, estudos em camundongos são importantes pela maior facilidade para obtenção de animais “knockouts” e maior variedade de ferramentas biotecnológicas disponíveis para o estudo da

patogenia das doenças induzidas experimentalmente nesses animais. Não é encontrada grande diversidade de informações sobre a NAE no camundongo. Atualmente, os grupos de Zhu J. e colaboradores e de Miletic e colaboradores são praticamente os únicos a publicar estudos de NAE em camundongos C57Bl/6. Entretanto, os resultados encontrados divergem em relação a sequência do peptídeo neuritogênico de P0, desenvolvimento e intensidade da doença. Alguns estudos sugerem que o camundongo SJL/J é susceptível a NAE, enquanto as linhagens BALB/C e C57BL/6, imunizadas utilizando-se o mesmo protocolo, são relativamente resistentes ao desenvolvimento da doença (ROSTAMI et al., 1990). A indução da NAE no camundongo C57Bl/6 tem uma utilidade particular uma vez que se trata de uma linhagem “background” para transgênicos e “knockouts”. A primeira descrição de indução da NAE nesses animais foi realizada em “knockouts” para CD4, CD8 e CD4/CD8 através de imunização passiva com células T reativas específicas a P2 obtidas de um outro animal previamente inoculado e estimuladas in vitro. Após receberem essas células os animais foram imunizados com mielina bovina, AFC e toxina pertussis (TP) (ZHU, J. et al. 1999). Em estudo posterior o desenvolvimento da NAE em C57Bl/6 foi obtido através da imunização ativa com peptídeo 180-199 de P0 associado à TP (ZOU et al., 2000). A intensidade e incidência da doença poderiam ser intensificadas através da administração de anticorpos antilinfócitos T citotóxicos, associados à molécula-4 (CTLA-4), ou seja, através do bloqueio da CTLA-4 (ZHU, J. et al., 2001). Desde então, tal grupo tem mantido o protocolo de imunização ativa com peptídeo 180-199 de P0 associado a injeções de TP nos estudos subsequentes. Entretanto, esse modelo de indução não tem sido reproduzido em estudos de outros grupos com resultados semelhantes.

1.1. Susceptibilidade e indução da NAE

No modelo inicialmente obtido (WAKSMAN e ADAMS, 1955) os sinais clínicos e histopatológicos apresentados pelos animais são semelhantes aos da SGB em humanos. Inicialmente, os animais apresentam ataxia, seguida de fraqueza muscular progressiva, com posterior recuperação. Nos nervos periféricos são encontrados desmielinização e infiltrados inflamatórios compostos principalmente por linfócitos e macrófagos. A partir de então, a teoria de que a SGB teria base autoimune foi reforçada e tal modelo experimental tem sido amplamente utilizado para a investigação dos mecanismos envolvidos na doença (ASBURY et al., 1978; ASBURY e CORNBLATH, 1990).

Estudos subseqüentes ao de Waksman foram realizados para identificar o componente neuritogênico do nervo periférico. O principal componente do nervo periférico é a mielina. A primeira evidência da importância da mielina foi verificada através de estudo que não obteve a NAE após imunização com fibras amielínicas do nervo periférico (ROBINSON, ALLT e EVANS, 1972) e de estudo que relacionou dose inoculada de MNP purificada à intensidade da doença. Verificou-se que a MNP induziu a NAE e que a gravidade da doença foi diretamente proporcional à dose utilizada (HAHN et al., 1988). As três principais proteínas da MNP, as quais juntas correspondem a aproximadamente 75% das proteínas totais, são: P0, P1 e P2. P0 é uma glicoproteína, enquanto P1 e P2 são proteínas básicas (GREENFIELD et al., 1973; DEIBLER et al. 1978). As três principais proteínas do nervo periférico foram isoladas e testadas para indução da NAE em algumas espécies. Verificou-se claramente que, no rato Lewis, a proteína P2 é neuritogênica e, portanto induz a doença (KADLUBWSKI E HUGHES, 1979). Sabe-se que a proteína P2 varia sua quantidade e distribuição no SNP conforme a espécie analisada. No homem e no coelho há menos P2 nos nervos periféricos que nas raízes ventrais, enquanto que no rato e na cobaia essas quantidades são praticamente iguais (GREENFIELD, BROSTOFF e HOGAN, 1980). A importância da proteína P2 para

indução da NAE no rato Lewis e em outras espécies foi confirmada por estudos subsequentes (HUGHES e POWEL, 1984; TAYLOR e HUGHES, 1985). O próximo passo foi estudar os epítomos dessa proteína que possuíam ação neuritogênica. As sequências de peptídeos 57-81, 53-78 e 61-70 da proteína P2 foram testadas e pôde se verificar que tais sequências induziam NAE em ratos Lewis e camundongos SJL/J dentre outras espécies (BROSTOFF et al. 1977, 1980; ROSTAMI et al., 1990; ROSTAMI e GREGORIAN, 1991; TAYLOR e HUGHES, 1985). A glicoproteína P0 é a mais abundante do nervo periférico. Calcula-se que componha aproximadamente 60% da proteína de membrana da mielina. A P0 é expressa especificamente nas células de Schwann e, portanto é encontrada somente na bainha de mielina dos nervos periféricos (WOOD e MCLAUGHLIN, 1975; FRANKO et al., 1982). Em cobaias, a imunização com proteína da mielina P0 purificada induziu a NAE, porém a intensidade da doença obtida foi moderada (WOOD e DAWSON, 1974). Em rato Lewis, a proteína P0 desenvolveu a NAE quando associada a injeções de lisofosfatidilcolina (MILNER et al., 1987). Alguns estudos com camundongos têm utilizado peptídeos da proteína P0 para indução da NAE. A sequência de peptídeos P0₁₈₀₋₁₉₉, associada a injeções de TP, foi utilizada para desenvolvimento da NAE em camundongos C57Bl/6 (ZOU et al., 2000). A sequência de P0₁₀₆₋₁₂₅ induziu a NAE em camundongos C57Bl/6, também associada a injeções de TP. Esse estudo comparou a sequência 180-199 a 106-125. Verificou que P0₁₀₆₋₁₂₅ produziu uma doença mais intensa (MILETIC et al., 2005). Entretanto, em ambos estudos a intensidade da NAE encontrada nessa linhagem de camundongo variou entre leve e moderada, não obtendo um modelo tão evidente quanto o encontrado em outras espécies susceptíveis.

A susceptibilidade a NAE é variável entre espécies e suas linhagens (STEINMAN, SMITH e FORNO, 1981; ROSTAMI, 1990a). Em ratos verifica-se que linhagens como Brown Norway e Sprague-Dawley são resistentes (HOFFMAN et al., 1980; ZHU et al., 1998b), já ratos Lewis são susceptíveis e amplamente usados nesse modelo experimental.

Algumas hipóteses sobre as razões da susceptibilidade do rato Lewis e de outras espécies têm sido estudadas. Pode estar relacionada a um gene autossômico dominante ligado à região do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (GASSER et al., 1973; MOORE et al., 1980). Pode também se relacionar aos baixos níveis de síntese de corticoesterona, a qual possui um efeito inibitório sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e TNF (MASSON, 1991; PEERS et al., 1995). Em camundongos a linhagem que parece apresentar maior susceptibilidade é a SJL/J. Verificou-se que esses camundongos desenvolviam a doença após imunização com proteína P2 bovina (TAYLOR e HUGHES, 1985). Os animais apresentaram sinais clínicos moderados e lesões histológicas características da NAE. Estudos subsequentes com essa linhagem mostraram predomínio de anormalidades eletrofisiológicas em relação às clínicas (DIEPERINK et al., 1991). Foi evidenciado ainda, que a NAE pode ser induzida por imunização com mielina de nervo periférico bovino (MNPB) associada à TP. A gravidade da doença pode ser intensificada com IL-12 (CÁLIDA et al., 2000). Embora tal modelo aparentemente seja reprodutível, não tem havido grande número de publicações com a sua utilização.

A indução da NAE pode ser realizada através de imunização ativa ou passiva. A imunização ativa ocorre quando há injeção de algum componente da mielina, gerando uma resposta ativa do sistema imunológico contra o antígeno. A imunização passiva consiste em transferir células T e/ou B específicas a um antígeno, obtidas de um animal previamente inoculado, a um animal saudável que posteriormente desenvolve a doença (LININGTON et al., 1992). A forma de indução, assim como o componente neuritogênico e sua quantidade interferem no tipo de desenvolvimento da NAE, resultando em diferentes padrões de evolução e intensidade da doença. Tais variações podem mimetizar subtipos da SGB, sendo aspectos relevantes nesse modelo experimental.

1.2. Patogênese da NAE

Na NAE é observada a seguinte sequência de eventos: ruptura da barreira hemato-neural; o extravasamento de imunoglobulina e a sua infiltração no espaço endoneural, juntamente com linfócitos T ativados e macrófagos e a desmielinização focal e perivascular nos nervos periféricos e suas raízes (HARTUNG et al., 1995). Atualmente, estudos têm evidenciado o envolvimento de células T e B, além de macrófagos e várias citocinas na imunopatogênese dessa doença (ZHU et al., 1994a,b; HARTUNG et al., 1996).

O passo inicial para o desencadeamento da resposta autoimune é o reconhecimento do antígeno. No local da injeção, antígenos da mielina são fagocitados, processados por macrófagos e levados aos linfonodos para apresentação aos linfócitos T CD4⁺ através das moléculas de classe II do complexo de histocompatibilidade (MHC II). Ao mesmo tempo, o adjuvante administrado conjuntamente ao antígeno desencadeia uma resposta imune inata. Essa reação estimula as células apresentadoras de antígeno (APC) a expressarem altos níveis de co-estimuladores, tais como B7-1 e B7-2, fornecendo mais um sinal para ativação das células T, estimulando a secreção de citocinas, tais como IL-12 (ABBAS A. e LICHTMAN A., 2005). A ligação do receptor CD28, expresso em células T “naive” e ativadas, às moléculas B7 das APCs, resulta em sinal co-estimulatório essencial para proliferação, produção de citocinas e sobrevivência das células T. O linfócito T citotóxico, associado à molécula 4 (CTLA-4) tem sido apresentado como um receptor secundário de B7. A ligação de B7 ao CTLA-4 resulta na regulação negativa, inibindo células T e assegurando a manutenção da homeostase imunológica (FREEMAN et al., 1992). Estudos com camundongos C57Bl/6 “knockouts” demonstraram a importância do CTLA-4 e CD28 no desenvolvimento da NAE. Camundongos C57Bl/6 CD28^{-/-} imunizados com peptídeo de P0₁₈₀₋₁₉₉, associado à TP, não desenvolveram NAE. O grupo controle (CD28^{+/+}) apresentou sinais clínicos e histológicos da doença com intensidade moderada (ZHU Y. et al., 2001a). Já camundongos C57Bl/6,

imunizados com P0₁₈₀₋₁₉₉, sem associação a TP, e tratados com anti-CTLA-4, foram capazes de quebrar a auto tolerância e desenvolveram a NAE (ZHU J. et al., 2001).

As células T não ativadas (“naive”) proliferam principalmente em resposta ao fator de crescimento autócrino IL-2, após as células encontrarem o antígeno e os co-estimuladores nos órgãos linfóides periféricos. A migração de células T efetoras, que já expressam moléculas de adesão e receptores de quimiocinas para locais de infecção, é estimulada pelas citocinas. Essas induzem a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais e a quimiotaxia de leucócitos. As células T ativadas entram no tecido nervoso periférico, reconhecem o antígeno e desempenham sua função efetora (STOLL et al., 1993; ARCHELOS et al., 1993). As células T CD4⁺ podem se diferenciar em subpopulações que produzem conjuntos diferentes de citocinas e assim desempenham funções efetoras distintas. O INF- γ é a citocina das células Th₁. IL-4 e IL-5 são as citocinas que definem Th₂. Há evidências de que a ativação diferencial dessas subpopulações tem um papel importante na indução e regulação das doenças autoimunes (NICHOLSON e KUCHROO, 1996). A diferenciação em Th₁ depende da ativação de macrófagos e células NK, as quais secretam e estimulam a produção de IL-12. O influxo de linfócitos T CD4⁺ Th₁ para o endoneuro induz a liberação de citocinas, dentre elas INF- γ e TNF- α (HARTUNG et al., 1990). A interação dessas células com os macrófagos presentes no local aumenta sua atividade fagocítica, estimula a produção de citocinas (IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α), proteases e intermediários reativos do oxigênio, óxido nítrico (NO) e enzimas lisossomais (BARON et al., 1993). Dependendo do antígeno o ataque autoimune poderá ser à bainha de mielina, resultando em desmielinização segmentar e bloqueio de condução, ou ao axônio, gerando perda axonal primária (HAFFER-MACKO et al., 1996a; 1996b).

1.2.1. *INF- γ na NAE*

O INF- γ estimula a atividade dos macrófagos e a produção de anticorpos IgG opsonizantes e fixadores do complemento (ABBAS A. e LICHTMAN A., 2005). Durante a evolução da NAE, o INF- γ é produzido pelas células CD4⁺ Th1 e células NK localizadas no endoneuro (SCHMIDT et al., 1992). O INF- γ promove ainda aumento da permeabilidade vascular e da expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais, macrófagos e células de Schwann e facilita a entrada de células inflamatórias no microambiente do nervo (McCARRON et al., 1993). Adicionalmente aumenta a expressão do MHC II nos macrófagos, possibilitando uma melhor interação com as células T CD4⁺, gerando expansão clonal e amplificação da resposta imune. Além disso, regula a isoforma induzível da sintase do óxido nítrico (iNOS) nas células de Schwann (GOLD, TOYKA e HARTUNG, 1995). O INF- γ foi encontrado em raízes nervosas de ratos que desenvolveram a NAE entre o 11º e 13º dia pós-imunização (p.i.), correlacionando-se também aos macrófagos ativados ao longo da evolução da doença (SCHMIDT et al., 1992). Os efeitos do INF- γ incluem regulação e modulação de IL-12, indução da produção de TNF- α e IL-1, além da sua própria produção. Para investigar o papel do INF- γ na NAE, camundongos C57Bl/6 “knockouts” para o receptor INF- γ (INF- γ R^{-/-}) foram imunizados com PO₁₈₀₋₁₉₉ associado à TP e comparados ao controle INF- γ R^{+/+}. Os dois grupos apresentaram sinais da NAE, entretanto o grupo INF- γ R^{-/-} desenvolveu uma doença mais leve, com intensidade e duração menores, indicando que INF- γ seria importante para o início da doença (ZHU Y., et al., 2001b). Há evidências de que INF- γ , TNF- α e IL-1 β em conjunto representem o mecanismo de desencadeamento da NAE (ZHU J. et al., 1998a).

1.2.2. *TNF- α na NAE*

O TNF- α é produzido por macrófagos, células T e células de Schwann (MURWANI et al., 1996). Os mecanismos patogênicos do TNF- α na NAE incluem modulação do MHC II,

ativação dos macrófagos, além do aumento da permeabilidade da barreira hemato-nervosa (JASINSKI et al., 1995). Alguns estudos apontam que o TNF- α poderia estar envolvido na destruição tecidual da NAE. A injeção intraneural de TNF- α em nervo ciático de camundongos e ratos gerou edema endoneural, acúmulo de leucócitos nos vasos endoneurais, degeneração axonal e desmielinização, principalmente de fibras perivasculares (REDFORD, HALL E SMITH, 1995; REDFORD et al., 1997). Trata-se de um dos mediadores chaves na regulação dos processos autoimunes, sua função é controlada por dois receptores, TNFR1 (p55) e TNFR2 (p75). Ambos são expressos em diferentes tipos de células, especialmente na superfície das células CD4⁺ e CD8⁺ ativadas. O TNFR2 relaciona-se principalmente às moléculas de TNF- α associadas à membrana. De acordo com o complexo TNF-receptor formado, pode ocorrer interiorização ou liberação do mesmo, representando um mecanismo de controle da ação do TNF- α (VANDENABEELE et al., 1995). A maioria das respostas atribuídas ao TNF- α são mediadas por TNFR1, o qual se liga preferencialmente ao TNF- α solúvel (LU MO., 2007; WARE et al., 1991; BAO et al., 2003). Formas solúveis de TNFR podem ser usadas objetivando inibir ou amenizar processos inflamatórios. Na NAE, a administração da forma solúvel de TNFR1 reduziu a intensidade e duração da doença, amenizando sinais clínicos e patológicos em camundongos C57Bl/6. Esse efeito protetor provavelmente envolveu o bloqueio da ação do TNF- α na ativação e recrutamento de células inflamatórias no SNP (BAO et al., 2003). Outro estudo desencadeou a NAE em camundongos C57Bl/6 “knockouts” para TNFR1. Os resultados mostraram que os animais TNFR1^{-/-} desenvolveram uma doença mais grave. Sendo assim, o TNF- α poderia ter um efeito modulador, prevenindo o desenvolvimento da NAE nesses animais (LU et al., 2007).

1.2.3. IL-12 na NAE

A IL-12 é uma citocina produzida por macrófagos, células dendríticas e células B. Particularmente importante nas fases iniciais da resposta imune, induz a ativação de células NK e a resposta Th1, esta através da diferenciação de células CD4 (TRINCHIERI, 1995). Através da ligação a receptores em células T CD4+, a IL-12 ativa a transcrição do fator STAT-4, o qual promove a diferenciação de células T em células Th1. As células T podem, adicionalmente, acentuar a produção de IL-12, por meio da ligação do CD40L, nas células T, ao CD40 nas APCs, estimulando a transcrição do gene da IL-12 (BAO et al., 2002). Células Th₁ secretam INF- γ que, além de promover uma maior proliferação das próprias células Th₁, ativam macrófagos. Esses produzem outras citocinas pró-inflamatórias, tais como o TNF- α , a IL-2, além da própria IL-12 (TRINCHIERI, 1998; O'GARRA, 1998). A IL-12 pode também induzir a proliferação de células B (JELINEK et al., 1995). Estudos mostram que os níveis de expressão de IL-12 mRNA no linfonodo e no nervo ciático correlacionam-se com a expressão do mRNA de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e INF- γ) e com a evolução clínica da NAE (ZHU J. et al., 1997; 1998). O tratamento de camundongos SJL/J imunizados com MBP com IL-12 prolongou a duração e intensificou os sinais clínicos e as lesões na NAE (CALIDA et al., 2000). A curva dose-resposta, entretanto deve ser considerada quando se pretende induzir NAE. Baixas concentrações de IL-12 (1,0 ng/ml) foram suficientes para induzir o aumento da proliferação de células Th₁, porém concentrações altas (100 ng/ml) não só suprimiram a proliferação da resposta Th₁, como também da Th₂ (BAO et al., 2002).

1.2.4. IL-2 e IL-6 na NAE

A IL-2 estimula a proliferação e diferenciação de células T, aumenta a atividade citolítica das células NK e promove a multiplicação e secreção de Ig por células B ativadas. É produzida predominantemente por células CD4+ Th₁ (HARTUNG et al., 1987). Na NAE as

concentrações de IL-2 declinam paralelamente aos sinais clínicos, indicando uma função patogênica nessa doença (ZHU J. et al., 1998a).

A IL-6 é secretada por diferentes tipos de células dentre elas, monócitos ativados, células T, células endoteliais e de Schwann. Os efeitos da IL-6 incluem estimulação de células B e indução da resposta na fase aguda. As células de Schwann respondem a IL-6 por expressão do mRNA IL-6 e expressão do receptor IL-6 (BOLIN et al., 1995). O aumento da IL-6 no SNP é verificado antes dos sinais clínicos da NAE e pode induzir a diferenciação de células do plasma em células B, envolvidas na produção de anticorpos anti-mielina (ZHU J. et al., 1994a; 1994b).

1.2.5. IL-18 e IL-17 na NAE

A IL-18 compartilha de propriedades imunológicas com IL-12, como estímulo da produção de INF- γ , aumento da citotoxicidade das células NK e estímulo a diferenciação de CD4⁺ em Th₁ (NAKANISHI et al., 2001). Camundongos tratados com anticorpos anti IL-18 apresentaram uma redução na gravidade da doença, enfraquecendo a resposta Th₁ nos nervos afetados (YU et al., 2002). Mais recentemente, um estudo com camundongos C57Bl/6 “knockouts” para IL-18 (IL-18^{-/-}) verificou que não houve diferença importante no desenvolvimento e evolução da NAE e nos sinais clínicos entre os grupos IL-18^{-/-} e controle. A IL-18 não impede o desenvolvimento da NAE, mas diminui os níveis de Th₁ e Th₂, indicando ser um co-indutor de ambas células Th (DUAN et al., 2007). A IL-17 é uma citocina produzida por células T ativadas e de memória que induz a produção de outras citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF, IL-1 e quimiocinas. Acredita-se que a IL-17 desempenhe um papel na amplificação de diferentes reações inflamatórias dependentes de células T (ABBAS, A.; LICHTMAN, A., 2005). Semelhante a outras citocinas, a IL-17 apresenta funções de proteção e patogenicidade. É importante na defesa contra organismos

infeciosos (HUANG, W. et al, 2004). Entretanto, elevados níveis de IL-17 intensificam a gravidade de doenças autoimunes, dentre elas a esclerose múltipla e a encefalite autoimune experimental (KOLLS J.K.; LIDEN A., 2004). A função da IL-17 nas fases aguda e crônica da NAE foi estudada em ratos Lewis. Verificou-se que a administração intranasal de rmIL-17 aumentou a intensidade da doença na fase aguda, porém reduziu a duração da fase crônica. Esses resultados apresentam a influencia da IL-17 nas duas etapas da NAE (PELIDOU et al., 2000).

1.2.6. Papel dos macrófagos na NAE

Os macrófagos são importantes para o desenvolvimento da NAE. As células CD4⁺ Th₁ ativam-nos por sinais mediados pelo contato, liberados pelas interações CD40L-CD40 e pela citocina IFN- γ . Os macrófagos ativados têm como mecanismo de destruição a fagocitose e posterior degradação do antígeno através de reativos de oxigênio, NO e enzimas lisossomais. Esses produtos estão presentes dentro dos fagossomos, mas podem ser liberados no tecido adjacente, causando lesões ao tecido normal (ABBAS e LICHTMAN, 2005). Reativos de oxigênio podem danificar a mielina e células de Schwann (KONAT e WIGGINS, 1985; BRÜCK et al., 1994). Macrófagos medeiam a desmielinização segmentar nas doenças autoimunes. Ocorre o ataque à mielina intacta de axônios normais. Outra forma de fagocitose da mielina ocorre na degeneração Walleriana, na qual os axônios degenerados têm suas bainhas de mielina degradadas e removidas (BRÜCK, 1997). Os macrófagos, ao contrário das células T, não são antígeno específicos e precisam de mecanismos adicionais para orientá-los ao alvo. Existem evidencias de que os anticorpos podem direcionar a ação dos macrófagos à mielina ou ao axônio nas neuropatias inflamatórias periféricas, dentre elas a NAE (KIEFER et al., 2001). Estudo in vitro mostrou que a mielina pode ser opsonizada por anticorpos, aumentando assim a fagocitose realizada pelos macrófagos (MOSLEY e CUZNER, 1996).

1.3. Aspectos clínicos e patológicos da NAE

Normalmente, os sinais clínicos iniciam-se com perda de peso e ataxia, seguidos de flacidez e fraqueza musculares ascendentes, culminando em paresias ou paralisias que podem chegar aos membros anteriores (SMITH et al., 1979). O pico dos sinais clínicos, em ratos Lewis, acontece entre o 13º e 18º dias pós imunização (p.i.), já em camundongos é comum encontrarmos esse pico entre o 20º e 24º dias p.i. Após esse período os sinais regridem de modo gradual e descendente (HAHN et al., 1991; CALIDA et al., 2000).

A NAE caracteriza-se histologicamente por infiltrado inflamatório nas raízes nervosas e nervos periféricos, constituído essencialmente por macrófagos e linfócitos, e por desmielinização primária (HAHN et al., 1991). Verifica-se que as raízes nervosas são afetadas com maior intensidade. Isso provavelmente está relacionado à permeabilidade da barreira sangue-nervo, a qual nas raízes é mais permeável aos constituintes séricos que nos nervos periféricos (ROSEN et al., 1990; HAHN et al. 1995). A desmielinização ocorre por ação dos macrófagos mediados por anticorpos anti-mielina (POWELL et al., 1984; KIEFER et al., 2001). Durante a recuperação da NAE ocorre remielinização dos axônios pelas células de Schwann. Essas fibras podem ser identificadas pela presença de bainha de mielina alterada (PENDER e McCOMBE, 1995). Os achados eletrofisiológicos relacionam-se a desmielinização primária e algumas vezes a degeneração axonal. A desmielinização primária encontrada na NAE pode ser demonstrada através de bloqueio ou diminuição da velocidade de condução, principalmente nas raízes nervosas (HARVEY e POLLARD, 1992).

1.4. Toxina Pertussis na indução da NAE

A TP é uma exotoxina produzida pela *Bordetella pertussis*, é conhecida pela sua propriedade adjuvante de induzir a resposta imune Th₁ (CASPI et al., 1996). Tem sido amplamente usada como fator estimulante da resposta mediada por Th₁ nas doenças

autoimunes órgão específicas, incluindo encefalite alérgica experimental (EAE) e NAE (RAINE, 1984; ZOU et al., 2000). Verificou-se que o efeito adjuvante da TP está associado à competência de indução e produção de citocinas pró-inflamatórias e expressão de moléculas co-estimulatórias como B7-1 e B7-2 nas APCs, o que influencia na diferenciação das células T (RYAN et al., 1998; SHIVE et al., 2000). Uma das principais APCs é a célula dendrítica, a qual é essencial para gerar e manter a resposta imune. Essa célula tem suas funções exacerbadas após a estimulação com TP, aumentando Th₁, induzindo a produção de INF- γ e secretando mais IL-12 (STEINMAN, 1991). A TP é uma substância vasoativa e afeta a permeabilidade da barreira hemato-nervosa. Essa propriedade pode facilitar o influxo de células inflamatórias no endoneuro, facilitando assim, o desenvolvimento de doenças autoimunes (BEM-NUN et al., 1993). Entretanto, estudos com modelo de uveíte autoimune experimental mostram que a TP pode inibir as respostas quando administrada em estágios avançados do desenvolvimento da doença. Essa característica inibitória foi atribuída à inibição da migração de células efetoras para os órgãos alvo e interrupção dos sinais da proteína G (SUN et al., 1997).

1.5. KM⁺ (Artim M) na indução da NAE

A KM⁺ ou Artin M é uma lecitina extraída da semente da Jaca (*Artocarpus integrifolia*) que apresenta propriedades biológicas importantes (RANI et al., 1999). Uma das propriedades dessa lecitina é induzir macrófagos a produzir IL-12 p40, os quais também estimulam a secreção de INF- γ por linfócitos. A injeção de Artin M em camundongos BALB/c induziu a inversão do padrão de diferenciação celular Th₂ para Th₁ (PANUNTO-CASTELO et al., 2001; PEREIRA-DA-SILVA et al., 2008). Assim, a Artin M na indução da NAE agiria como um potencializador, aumentando a produção de IL-12 e o padrão de diferenciação dos linfócitos T CD4⁺ em Th₁.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

O objetivo geral desse estudo foi investigar o desenvolvimento e evolução da NAE em camundongos C57Bl/6, caracterizando seus sinais clínicos e histológicos.

2.2. Específicos

- Avaliar a dose do peptídeo P0₁₈₀₋₁₉₉ suficiente para indução da NAE e caracterizar os sinais clínicos e histológicos correspondentes.

- Verificar a influência da forma de injeção da TP no desencadeamento e evolução da doença.

- Verificar a influência da lectina KM⁺ (Artin M) como indutor da liberação de IL-12, no desencadeamento e evolução da NAE.

- Investigar a presença de infiltrado inflamatório e desmielinização em amostras do nervo isquiático e de suas raízes espinhais em diferentes fases da doença.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6, machos, com idade entre 6 e 8 semanas, pesando de 18 a 20g. Os animais foram adquiridos do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP e do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Unicamp. Foram transferidos para o Biotério do Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (LNAE). Esses animais foram mantidos em ambiente com ciclo de luminosidade de 12 horas por dia, temperatura de 20 a 24°C, recebendo dieta padrão do biotério e água “*ad libitum*”.

Os protocolos experimentais foram aprovados em projeto encaminhado ao Comitê de Ética e Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Protocolo nº. 027/2008). Todo o manuseio dos animais foi realizado levando-se em consideração princípios éticos para uso de animais na educação e na pesquisa.

3.2 Antígeno

O peptídeo neuritogênico utilizado corresponde a sequência de aminoácidos 180-199 da proteína P0 da mielina de nervo periférico bovino. Esse foi sintetizado em laboratório pela Genemed Synthesis Inc. (San Francisco, CA, USA) com seguinte sequência de aminoácidos SSKRGRQTPVLYAMLDHSRS.

3.3. Indução da NAE

Quarenta e oito animais foram imunizados por duas injeções subcutâneas nas patas posteriores e no dorso (base da cauda), respectivamente nos dias 0 e 7º pós-imunização (p.i.). Em cada dia de imunização receberam 100µl de emulsão, distribuídos equitativamente nas

patas. Nos dias -1, 0, 1 e 3 p.i. os animais receberam injeções de TP (Fluka), contendo respectivamente 400ng, 200ng, 200ng e 200ng cada.

Para comparação das doses de peptídeo utilizadas, os animais foram divididos e nomeados grupos 1 e 2. Para comparação entre as formas de injeção da TP, os grupos foram subdivididos em 1A, 1B, 2A e 2B.

GRUPO 1A (n=16)

- 200 µg de P₀₁₈₀₋₁₉₉
- 500 µg de *Mycobacterium tuberculosis* (H37RA; Difco, Detroit, MI)
- 50 µl de PBS
- 50 µl de AFC (0.5mg *Mycobacterium tuberculosis* – Sigma)
- TP intravenosa

GRUPO 1B (n=16)

- 200 µg de P₀₁₈₀₋₁₉₉
- 500 µg de *Mycobacterium tuberculosis* (H37RA; Difco, Detroit, MI)
- 50 µl de PBS
- 50 µl de AFC (0.5mg *Mycobacterium tuberculosis* – Sigma)
- TP intraperitoneal

GRUPO 2A (n=8)

- 60 µg de P₀₁₈₀₋₁₉₉
- 500 µg de *Mycobacterium tuberculosis* (H37RA; Difco, Detroit, MI)
- 50 µl de PBS
- 50 µl de AFC (0.5mg *Mycobacterium tuberculosis* – Sigma)
- TP intravenosa

GRUPO 2B (n=8)

- 60 µg de P0₁₈₀₋₁₉₉
- 500 µg de *Mycobacterium tuberculosis* (H37RA; Difco, Detroit, MI)
- 50 µl de PBS
- 50 µl de AFC (0.5mg *Mycobacterium tuberculosis* – Sigma)
- TP intraperitoneal

Além dos quatro grupos anteriores, outro grupo (GRUPO 3) foi feito para adição de KM⁺ (Artin M) ao protocolo de indução. Doze animais foram imunizados segundo o mesmo protocolo do grupo 2B. Adicionalmente receberam injeções i.p. de 50µl contendo 10 µg de KM⁺, nos dias 0 e 7º pós imunização.

GRUPO 3 (n=12)

- 60 µg de P0₁₈₀₋₁₉₉
- 500 µg de *Mycobacterium tuberculosis* (H37RA; Difco, Detroit, MI)
- 50 µl de PBS
- 50 µl de AFC (0.5mg *Mycobacterium tuberculosis* – Sigma)
- TP intraperitoneal
- KM⁺ intraperitoneal

GRUPO CONTROLE

Os controles pareados receberam duas injeções contendo apenas AFC + PBS.

3.4. Avaliação clínica da NAE

A partir do dia anterior à imunização os animais foram pesados e avaliados diariamente até o 40º dia p.i. Os sinais clínicos foram graduados de 0 a 10, de acordo com a escala de avaliação clínica abaixo:

Tabela 1 – Escala de classificação clínica da NAE (KING E THOMAS, 1983)

Grau	Estado do animal
0	Normal
1	Menos atividade
2	Hipotonia dos músculos (queda) da cauda
3	Dificuldade de manter-se ereto
4	Marcha atáxica
5	Paralisia leve das patas posteriores
6	Paralisia moderada das patas posteriores
7	Paralisia severa das patas posteriores
8	Tetraparesia
9	Aspecto moribundo
10	Morto

3.5. Avaliação Histológica

Previamente ao início dos procedimentos os animais foram pesados, anestesiados com Ketamina e Xilazina (75 e 15 mg/kg peso corporal, respectivamente) via intraperitoneal. A seguir, foram posicionados em decúbito dorsal na mesa cirúrgica, para a realização da perfusão intracárdica através do ventrículo esquerdo, inicialmente com solução salina tamponada (PBS a 0,05M), para lavagem de órgãos e vasos e seguida de solução fixadora de

glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio a 0,1M. Finalizada a perfusão, os animais foram posicionados em decúbito ventral, com seus membros anteriores e posteriores imobilizados em abdução. O nervo isquiático e as raízes espinhais foram dissecados em ambos os lados. O nervo isquiático foi retirado proximalmente, após a emergência pelo forame isquiático maior, e no terço distal da coxa, próximo à fossa poplítea. As raízes nervosas retiradas dos segmentos medulares L3 a L6. Os espécimes foram colocados em solução fixadora de glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio (0,1M), na proporção de 12% e 88%, respectivamente, e pH 7,4. Permaneceram nessa solução durante 48 horas a 4° C, para fixação.

Após esse período, os fragmentos oriundos do lado esquerdo foram pós-fixados em tetróxido de ósmio (OsO_4) a 1% e incluídos em resina Epon 812, para obtenção de cortes transversais e longitudinais, semifinos ($0,5\mu\text{m}$), corados com azul de toluidina e Azur. Os fragmentos do lado direito foram incluídos em parafina para realização de cortes histológicos transversais e longitudinais, corados com Hematoxilina e Eosina (HE).

As amostras foram retiradas nos seguintes dias p.i.: 18°, 20°, 24°, 28°, 32°, 40°.

3.6. Análise estatística

O teste de Kruskal Wallis e o post hoc de Dunn foram utilizados para comparação entre os 5 grupos para análise da evolução clínica. As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0.05$.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Grupos 1A e 1B

4.1.1. Evolução Clínica

Os animais dos grupos 1A e 1B receberam 200 μ g do peptídeo P0₁₈₀₋₁₉₉, diferenciando-se na forma de injeção da TP: i.v. ou i.p. Observou-se diminuição do peso em 100% dos animais até o 20º dia p.i. (± 4), tanto no grupo que recebeu TP i.v. (1A), quanto no grupo que recebeu TP i.p. (1B). No grupo 1A os primeiros sinais clínicos apareceram no 11º dia p.i. O pico da doença aconteceu entre o 19º e o 22º dia p.i., sendo que a maior média encontrada foi de 1,63 ($\pm 0,5$), no 20º dia p.i. Entretanto, a média geral da classificação clínica foi de 0,79 ($\pm 0,5$). A maioria dos animais (12/16) apresentou hipotonia da cauda (grau 2), mas sem sinais de paresia ou paralisia dos membros posteriores. A média de duração dos sinais clínicos foi de 11,06 dias ($\pm 4,3$). No grupo 1B os valores de pico apresentaram-se entre o 20º e 22º dia p.i., a maior média encontrada foi de 1,56 ($\pm 0,51$). A diminuição de atividade (grau 1) foi encontrada em todos os animais do grupo e a queda da cauda (grau 2) foi observada em 68% deles (11/16). A média dos sinais clínicos durante todo o período foi de 0,73 ($\pm 0,51$). A duração desses sinais teve média de 10,1 dias ($\pm 4,0$). Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos 1A e 1B quando comparadas as médias gerais de classificação clínica e as médias dia a dia (do 10º ao 29º dia p.i.).

Tabela 2 – Sinais clínicos na evolução da NAE nos grupos 1A e 1B.

<i>Grupo</i>	<i>Média de classificação clínica</i>	<i>Média no pico dos sinais clínicos</i>	<i>Média de duração dos sinais clínicos (dias)</i>
1A - P0 200 μ g + TP i.v.	0,79 ($\pm 0,50$)	1,63 ($\pm 0,50$)	11,06 ($\pm 4,3$)
1B - P0 200 μ g + TP i.p.	0,73 ($\pm 0,51$)	1,56 ($\pm 0,51$)	10,12 ($\pm 4,0$)

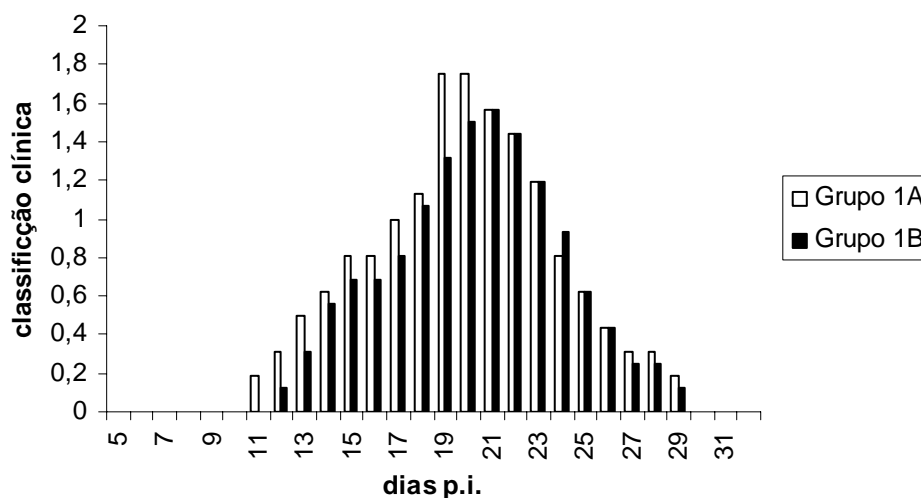


Gráfico 1. Evolução dos sinais clínicos apresentados pelos animais dos grupos 1A e 1B. Os primeiros sinais apareceram entre o 11º e 13º dias p.i. O pico aconteceu entre o 19º e o 23º dias p.i. Os sinais perduraram até o 30º dia p.i.

4.1.2. Aspectos histológicos

Na avaliação histológica do grupo 1A encontramos infiltrado inflamatório endoneural nos fragmentos do nervo isquiático de um animal, no 20º dia p.i. (Figura 1). As demais amostras retiradas dos animais nos 18º, 24º, 28º, 32º e 40º dias p.i. apresentaram alterações isoladas (Figura 2 e 3). No grupo 1B verificamos a presença de infiltrado inflamatório epineural em fragmentos do nervo isquiático e das raízes nervosas, no 18º dia p.i. e 20º dias p.i., respectivamente (Figuras 4). Discreto infiltrado endoneural na raiz nervosa de um animal, no 24º dia p.i. (Figura 5). Verificamos que dos dezesseis animais imunizados no grupo A, apenas um apresentou alteração histológica importante. No grupo 1B, a incidência de alterações foi um pouco maior, sendo encontradas três amostras com presença de infiltrado inflamatório, no 18º, 20º e 24º dias p.i. Nenhuma das amostras analisadas mostrou sinais de desmielinização. Nesses dois grupos a quantidade de animais sacrificados nas datas determinadas foi: 18º (n=3), 20º (n=3), 24º (n=3), 28º (n=3), 32º (n=2) e 40º (n=2).

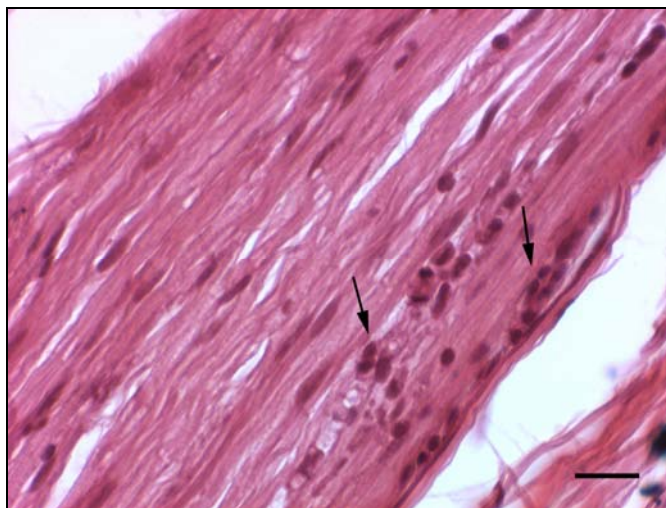


Figura 1 - Fragmento do nervo isquiático no 20º dia p.i. Grupo 1A. Setas indicam presença de discreto infiltrado inflamatório endoneural. Corte em parafina, corado com HE. Barra 20 μ m.

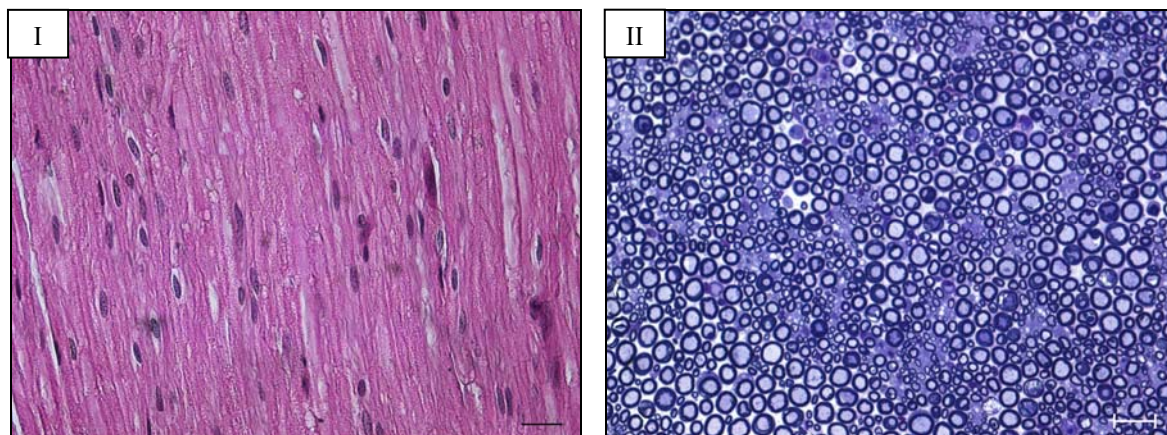


Figura 2 - I. Fragmento da raiz nervosa no 24º dia p.i. Grupo 1A. O corte histológico em parafina não apresenta sinais de infiltrado inflamatório, fragmento sem alterações morfológicas. Coloração HE. Barra 20 μ m. II. Corte semi fino do nervo isquiático no 28º dia p.i. Grupo 1A. Ausência de alterações histológicas e de células inflamatórias. Azul de Toluidina. Barra 20 μ m.

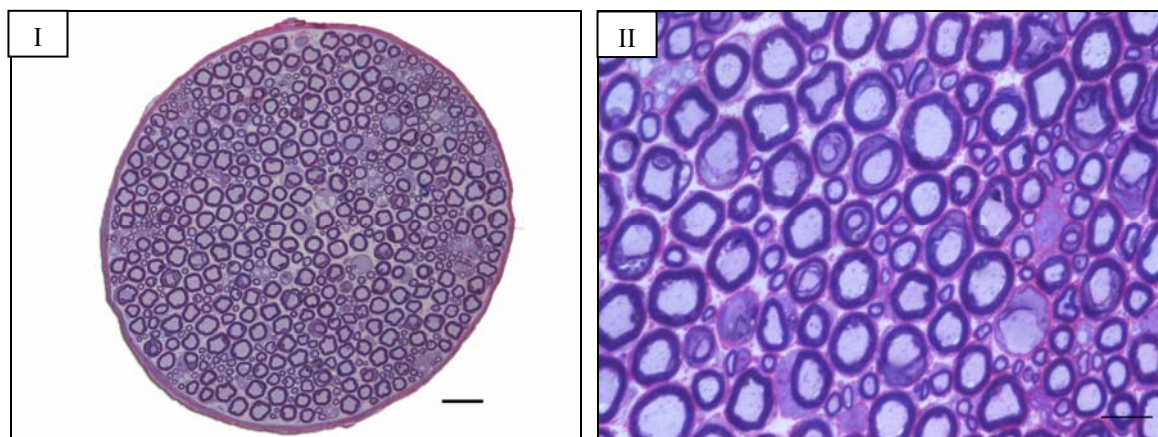


Figura 3 – I. Fragmento do nervo isquiático, no 40º dia p.i. Grupo 1A. Corte semi fino, corado com azur, sem evidência de alterações. Barra 20µm. II. Área endoneural ampliada da secção transversal do nervo isquiático. Corte semi fino (0,5 µm). Coloração Azur. Barra 10 µm.

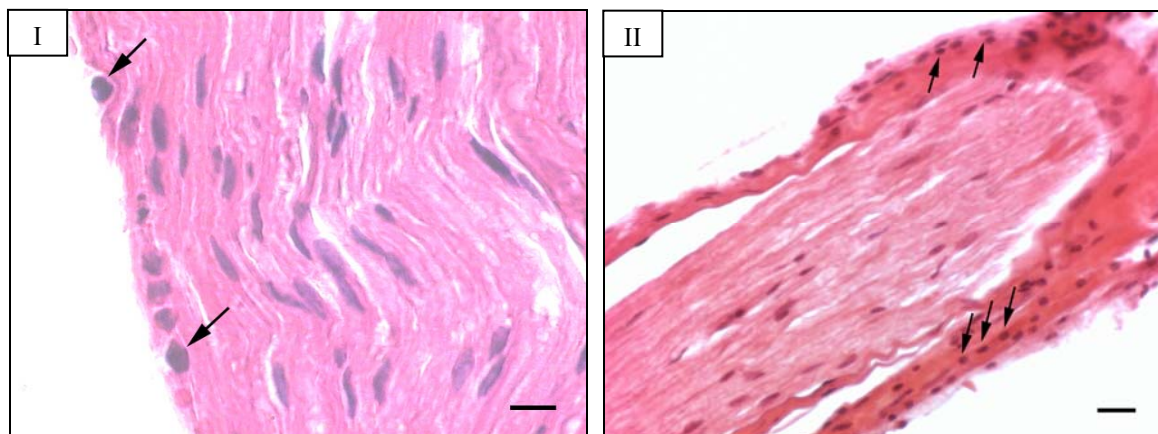


Figura 4 – I. Secção longitudinal da raiz de nervosa no 18º dia p.i. Grupo 1B. Setas indicam discreto infiltrado inflamatório epineural. Corte em parafina corado com HE. Barra 10 µm. II. Fragmento de raiz do nervo isquiático no 20º dia p.i. Grupo 1B. Presença de células inflamatórias perineurais. Corte longitudinal, em parafina corado com HE. Barra 20µm.

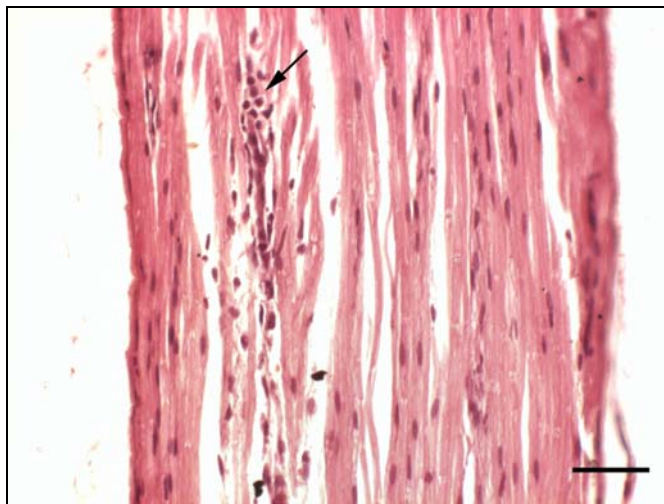


Figura 5 - Fragmento do nervo isquiático no 24º dia p.i. Grupo 1B. Seta indica presença de infiltrado inflamatório endoneural. Corte em parafina corado com H&E. Barra 50 μ m.

4.2. Grupos 2A e 2B

4.2.1. Evolução clínica

Nos grupos 2A e 2B as imunizações foram realizadas com 60 μ g de P0₁₈₀₋₁₉₉. No grupo 2A, o qual recebeu TP i.v., os primeiros sinais clínicos apareceram no 13º dia p.i. A média de classificação clínica durante a evolução da doença foi de 0,71 (\pm 0,4) e o pico da doença aconteceu entre o 19º e o 22º dia p.i. A maior média encontrada foi de 1,5 (\pm 0,5), no 20º e 21º dia p.i. Nesse grupo, todos os animais (n=8) apresentaram diminuição da atividade (grau 1) e cinco evoluíram para queda da cauda (grau 2). A média de duração dos sinais clínicos foi de 10,5 (\pm 4) dias. No grupo 2B, os primeiros sinais apareceram no 16º dia p.i., estenderam-se até o 27º dia p.i. A média da classificação clínica foi 0,6 (\pm 0,4) e o pico manteve-se entre o 20º e 22º dias p.i. A maior média encontrada foi de 1,38 (\pm 0,7), no 21º dia p.i. Dos oito animais imunizados, 87% apresentaram diminuição da atividade (grau 1) e 50% apresentaram queda da cauda (grau 2). A média de duração dos sinais clínicos foi de 7,5 (\pm 4) dias. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos 2A e 2B se comparadas as médias

gerais de classificação clínica. Quando foram comparadas as médias dia a dia (do 10º ao 29º dia p.i.) foi verificado que no 14º dia p.i. os sinais clínicos do grupo 2A foram significativamente maiores que os de 2B ($p \leq 0,05$). Isso provavelmente porque os primeiros sinais do grupo 2B apareceram no 16º dia p.i.

Tabela 3 – Sinais clínicos na evolução da NAE nos grupos 2A e 2B.

Grupo	Média de classificação clínica	Média no pico dos sinais clínicos	Média de duração dos sinais clínicos (dias)
2A - P0 60µg + TP i.v.	0,71(± 0,4)	1,50 (± 0,5)	10,5 (± 4)
2B - P0 60 µg + TP i.p.	0,64 (± 0,4)	1,38 (± 0,7)	7,5 (±4)

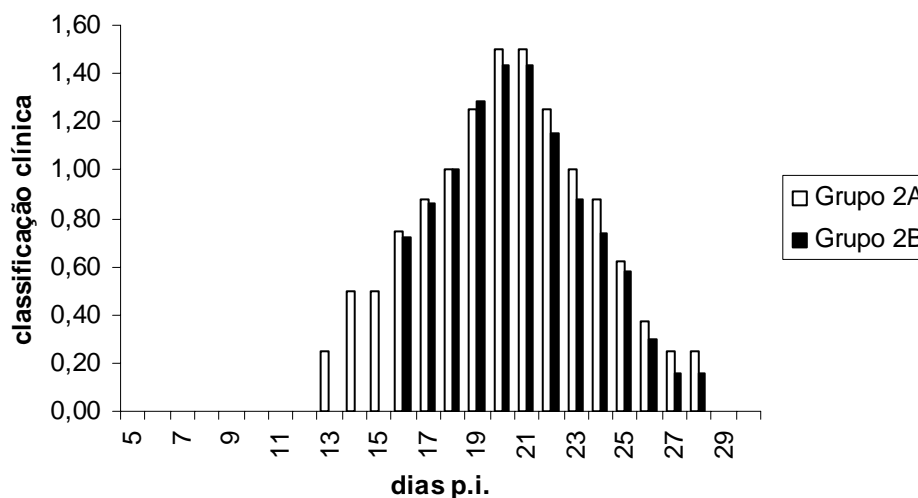


Gráfico 2. Evolução dos sinais clínicos apresentados pelos animais dos grupos 2A e 2B. Os primeiros sinais apareceram entre o 13º e 16º dias p.i. O pico aconteceu entre o 20º e o 22º dias p.i. Os sinais perduraram até o 28º dia p.i.

4.2.2. Aspectos histológicos

No grupo 2A foi observado infiltrado inflamatório epineural em espécimes do nervo isquiático de dois animais no 18º e 20º dia p.i. (Figura 6). Nas amostras do grupo 2B encontramos infiltrado inflamatório endoneural nas raízes nervosas de um animal, no 24º dia

p.i. (Figura 7). Nas demais amostras do nervo isquiático e raízes, retiradas nos 28°, 32° e 40° dias p.i., foram encontradas algumas células inflamatórias esparsas e não foram observados sinais de desmielinização em ambos os grupos (Figura 8). Verificamos que 25% dos animais do grupo 2A e 12% dos animais do grupo 2B apresentaram maiores alterações histológicas. Nesses dois grupos a quantidade de animais sacrificados nas datas determinadas foi: 18° (n=1), 20° (n=2), 24° (n=2), 28° (n=1), 32° (n=1) e 40° (n=1).

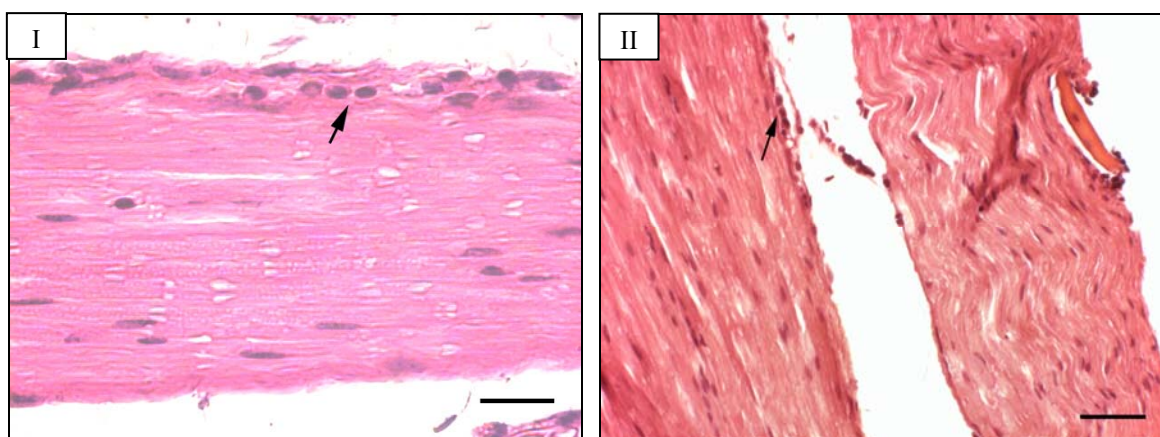


Figura 6 – I. Fragmento do nervo isquiático no 18° dia p.i. Grupo 2A. Seta indica discreto infiltrado inflamatório na região sub-perineural. Corte em parafina corado com HE. Barra 25 μ m. II. Secção longitudinal do nervo isquiático no 20° dia p.i. Grupo 2A. Seta indica infiltrado pequeno inflamatório perineural. Barra 50 μ m.

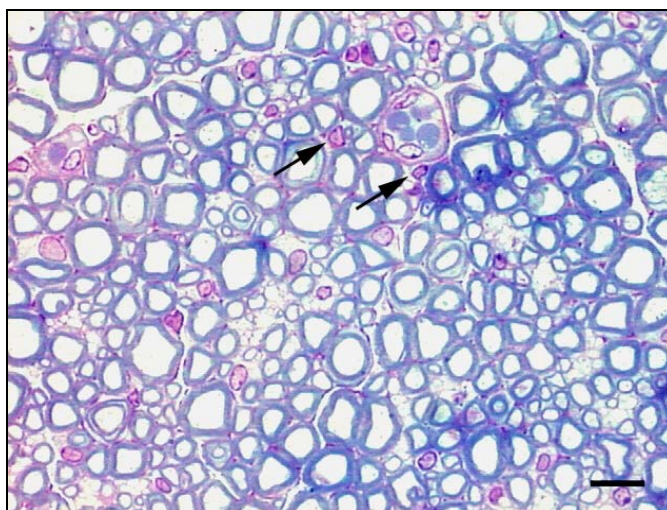


Figura 7 – Secção transversal de raiz nervosa no 24° dia p.i. Grupo 2B. Setas indicam presença de algumas células inflamatórias no endoneuro. Corte semifino corado com Azur. Barra 10 μ m.

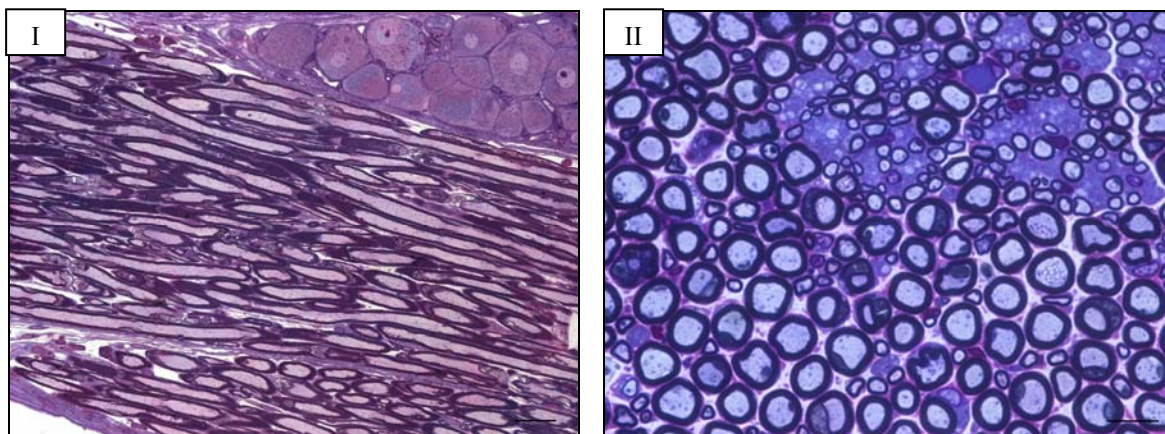


Figura 8 – I. Secção longitudinal de raiz nervosa no 40º dia p.i. Grupo 2B. Sem evidências de alterações. Corte semifino corado com Azur. Barra 20µm. II. Secção transversal de raiz nervosa no 32º dia p.i. Grupo 2B. Ausência de células inflamatórias ou alterações morfológicas. Corte semifino corado com Azul de toluidina. Barra 10µm.

4.3. Grupo 3

4.3.1. Evolução clínica

Esse grupo recebeu 60µm de P0₁₈₀₋₁₉₉ + TP i.p. associados à KM⁺. Nesse os primeiros sinais clínicos apareceram no 13º dia p.i., seguindo até o 26º dia p.i., a média da duração desses sinais foi de 8,3 (±5) dias. A maioria dos animais (75%) teve apenas diminuição da atividade (grau 1). Somente 16% deles apresentaram queda da cauda (grau 2). A média geral de classificação clínica foi 0,5 (±0,3), sendo que a maior média foi encontrada entre o 19º e 22º dias, correspondendo a 0,92 (±0,6). Não foram encontradas diferenças significativas entre o grupo 3 e os demais grupos quanto às médias de classificação clínica do período. Quando se analisaram essas médias por dia, foi verificado que o grupo 3 apresentou sinais clínicos mais discretos em relação ao grupo 1A nos dias 15º, 19º e 20º p.i. ($p \leq 0,05$). Essa diferença não foi verificada quando o grupo 3 foi comparado aos demais.

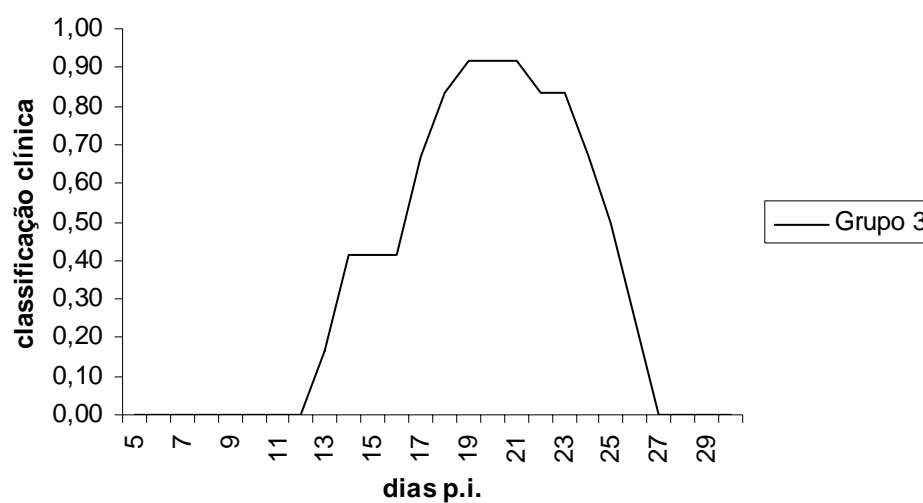


Gráfico 3. Evolução dos sinais clínicos apresentados pelos animais do grupo 3. Os primeiros sinais apareceram no 13º seguindo até o 26º dia p.i. O pico aconteceu entre o 19º e 22º dias p.i.

4.3.2. Aspectos histológicos

No grupo 3 não foram encontradas alterações importantes nas amostras colhidas dos doze animais estudados. Observamos em amostras do nervo isquiático de um animal no 24º dia p.i., intenso infiltrado inflamatório perineural (Figura 9). Nas demais amostras analisadas verificamos ausência de infiltrado inflamatório epineural ou endoneural e ausência de desmielinização (Figura 10). Nesse grupo foram sacrificados dois animais em cada data determinadas.

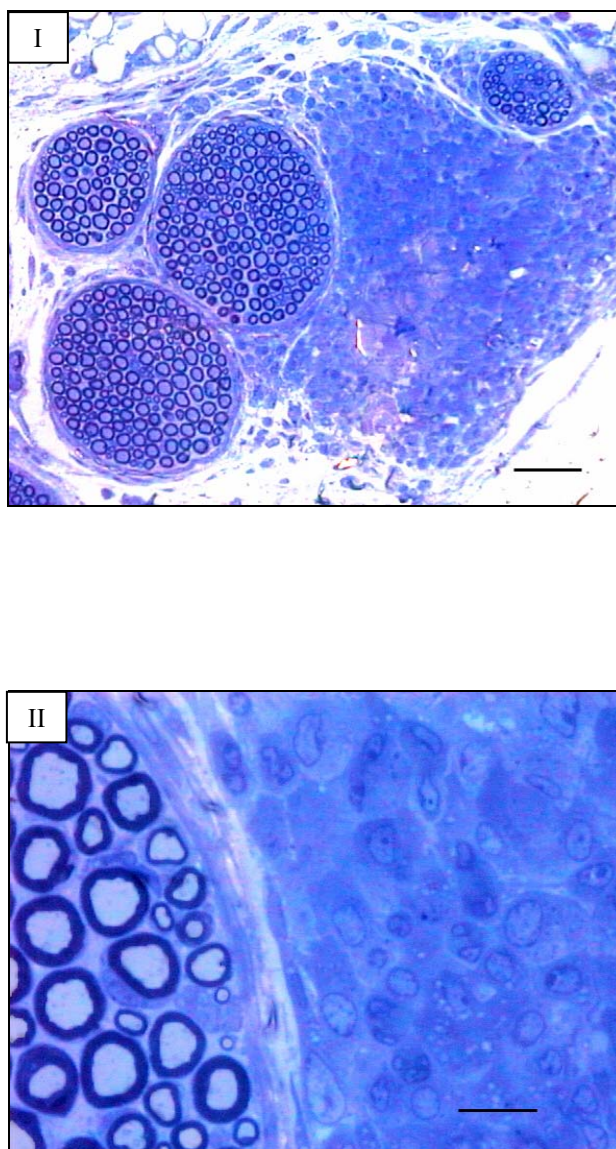


Figura 9 – I. Fragmento distal do nervo isquiático. Animal no 24º dia p.i. Grupo 3. Presença de infiltrado inflamatório epineural. Cortes 0,5 μ m, corados com azul de toluidina. Barra 70 μ m. II. Área ampliada de secção transversal do nervo isquiático, em evidência o infiltrado inflamatório perineural. Barra 10 μ m.

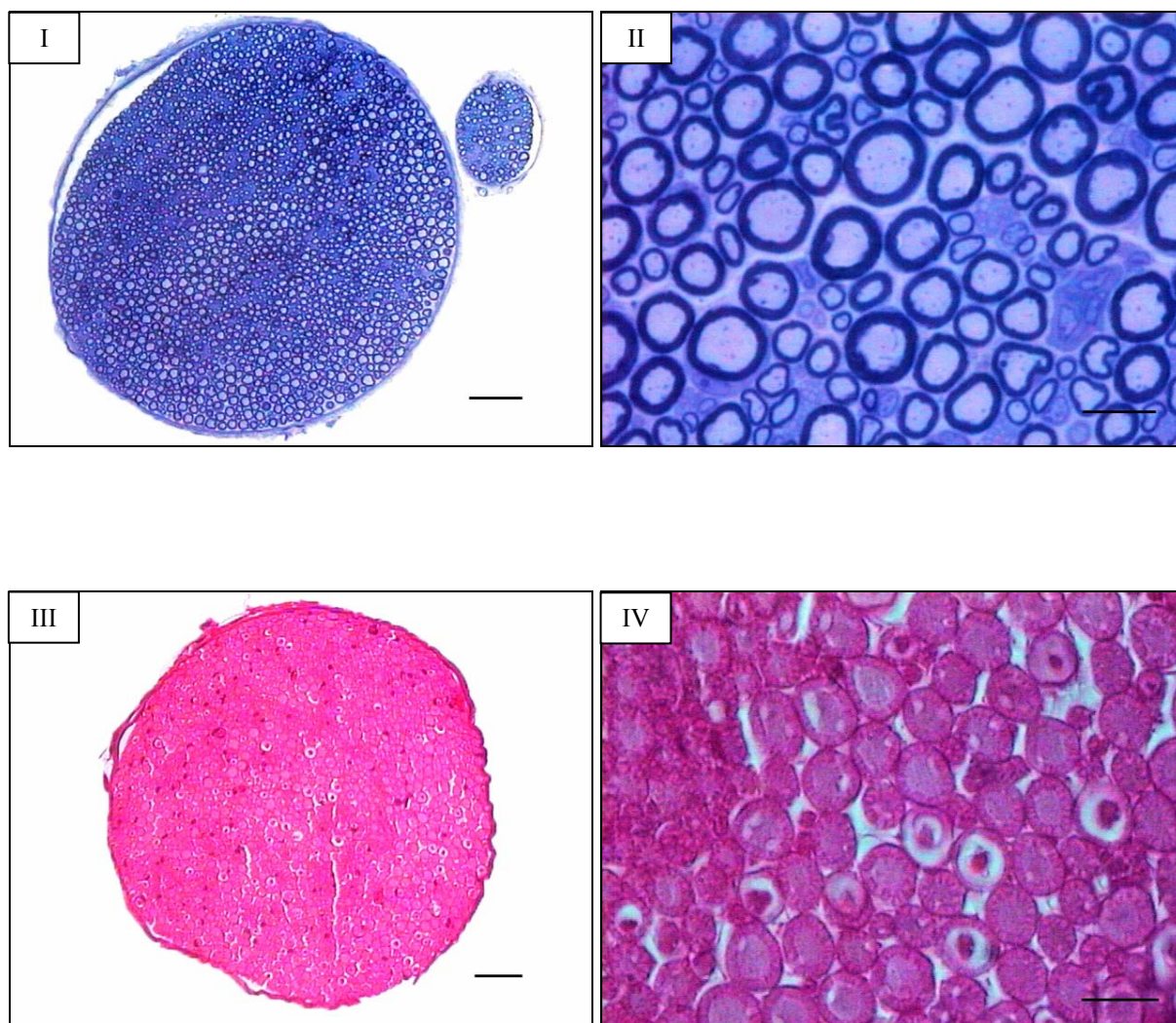


Figura 10 – I. Fragmento distal do nervo isquiático de um animal no 32º dia p.i., sem alterações. Grupo 3. Corte de 0,5µm, corados com azul de toluidina. Barra 30µm. II. Área endoneural ampliada de secção transversal do nervo isquiático. Animal no 32º dia p.i., não foram observados alterações. Grupo 3. Corte 0,5 µm, corado com azul de toluidina. III. Fragmento distal do nervo isquiático retirado no 28º dia p.i. Grupo 3. Ausência de infiltrado inflamatório. Inclusão em parafina colorado com HE. Barra 20µm. IV. Área endoneural ampliada da secção transversal do nervo isquiático, sem alteração. Animal no 28º dia p.i. Grupo 3. Inclusão em parafina, coloração HE. Barra 10µ.

4.4. Comparação entre os grupos

Inicialmente foram comparados os cinco grupos em relação à média dos sinais clínicos e não foram encontradas diferenças significativas entre eles. Entretanto, foi observado que houve uma tendência do grupo 1A apresentar os sinais mais intensos e do grupo 3 apresentar os menos intensos (Tabela 4). Ao compararmos a média desses sinais em cada dia (do 10º ao 29º dia p.i.) foi verificada a existência de diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre alguns grupos, em determinados dias. No 15º dia p.i. o grupo 1A apresentou média clínica significativamente maior que o grupo 3 (0,81 e 0,42, respectivamente). No 19º dia p.i. a média de classificação clínica de 1A também foi significativamente maior que a dos grupos 3 e 2B (1,63 > 0,92 e 1,0, respectivamente). Ainda no 19º dia p.i., o escore do grupo 1B foi significativamente maior que o do grupo 2B (1,31 e 1,0, respectivamente).

A classificação clínica variou entre grau 1 e 2. Pode-se considerar que grau 1 corresponda ao estado geral do animal e não necessariamente à alteração neurológica. Enquanto que o grau 2 pode ser visto como uma alteração neurológica. Nos animais imunizados foi observado que 90% apresentaram sinais clínico-neurológicos, 57% tiveram diminuição da atividade (grau 1) e queda da cauda (grau 2) e 33% apresentaram apenas diminuição da atividade. Dentre os animais que apresentaram grau 2, 75% eram do grupo 1A e 68% do grupo 1B. Nos grupos 2A e 2B foi verificado que 62,5% e 50%, respectivamente, evoluíram para queda da cauda. No grupo 3 16% dos animais apresentaram queda da cauda.

Células inflamatórias esparsas foram constatadas em amostras dos animais com sinais clínicos, entretanto infiltrado inflamatório endoneural, epineural ou perineural foi encontrado em 11% dos animais imunizados, considerando os 5 grupos. Desses animais, todos apresentavam grau 2 na classificação clínica. Infiltrados epineurais ou perineurais foram observados em 8% dos animais imunizados e infiltrados endoneurais em 5% deles. Entre os grupos, foi verificado que o grupo 2A apresentou maior número de amostras com células

inflamatórias, seguido pelos grupos 1B, 2B, 3 e 1A. Porém, o infiltrado endoneural foi encontrado somente nos grupos 1A e 1B os quais apresentaram a mesma incidência (6,2%).

Tabela 4 – Médias dos sinais clínicos da NAE correspondentes aos 5 grupos estudados.

<i>Grupo</i>	<i>Média de classificação clínica</i>	<i>Média no pico dos sinais clínicos</i>	<i>Média de duração dos sinais clínicos (dias)</i>	<i>Incidência Queda da cauda (grau 2)</i>	<i>Infiltrado inflamatório no peri, epi ou endoneuro</i>
1A	0,79 ±0,5	1,62 ±0,5	11,06 ±4	75%	6,2%
1B	0,73 ±0,5	1,56 ±0,5	10,12 ±4	68%	18,7%
2A	0,71 ±0,4	1,50 ±0,5	10,5 ±4	62%	25%
2B	0,64 ±0,4	1,38 ±0,7	7,5 ±4	50%	12,5%
3	0,50 ±0,3	0,92 ±0,6	8,3 ±5	16%	8,3%

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Considerando os 5 grupos, noventa por cento dos camundongos apresentaram algum sinal clínico-neurológico, em 33% foi observada apenas diminuição da atividade e em 57% dos animais foi verificado, queda da cauda, ainda que discreta. Em geral a intensidade do comprometimento motor na NAE induzida no camundongo C57Bl/6 é pequena. Em estudos iniciais a intensidade e incidência de sinais neurológicos foram semelhantes às observadas no presente estudo ficando também evidente a necessidade do uso de TP, vez que, quando não utilizada, a incidência da doença foi de 42% e a intensidade do comprometimento foi menor (ZOU et al., 2000; ZHU J. et al., 2001). Estudo posterior confirmou a pouca intensidade do comprometimento motor em camundongos C57Bl/6 selvagens (LU MO et al., 2007). A tentativa de reprodução do modelo por outro grupo, utilizando o peptídeo e TP, se associou a sinais ainda menos intensos (nenhum dos animais teve queda completa da cauda ou diminuição de força muscular) em 53% dos animais (MILETIC et al, 2005). Essa pouca intensidade de sinais – limitados a encurvamento da cauda – eventualmente foi encontrada em apenas 33% dos animais em outro estudo (MIYAMOTO et al., 2003). Contrastando com a pouca intensidade de sintomas, em outros estudos do grupo que descreveu o modelo, os camundongos chegaram a apresentar paraparesia grave, além da queda completa da cauda (ZHU Y. et al, 2001a; 2001b; 2002; BAO L. et al., 2002).

Em apenas 5% dos camundongos do presente estudo foram encontrados infiltrados inflamatórios no endoneuro e, em 8% esses infiltrados ocorreram exclusivamente no epineuro e ou perineuro, embora células inflamatórias esparsas tenham sido constatadas em amostras de todos os animais com sinais clínicos. Não foi encontrada desmielinização segmentar quando foram analisadas as secções transversais dos cortes semifinos. Há referência de que alguns animais não apresentaram infiltrados inflamatórios nem desmielinização segmentar, apesar de terem apresentado sinais clínicos (ZOU et al. 2000). Discreto infiltrado macrofágico

e linfocítico, no endoneuro, sem evidência de desmielinização ou danos axonais foi referido (MILETIC et al, 2005). Um “infiltrado celular difuso” (100 células por mm²), associado a fibras degeneradas no nervo ciático no 14º dia pós-imunização em camundongos C57Bl/6 selvagens foi referido, embora as imagens de corte semifino que documentam o estudo não sejam convincentes (MIYAMOTO et al., 2003).

No presente estudo foi verificado infiltrado inflamatório em alguns animais no nervo isquiático e em outros animais nas raízes. Desmielinização na cauda equina e no nervo isquiático foi documentada, sem especificação de topografia exclusiva ou predominante e nem da extensão e da intensidade da referida desmielinização (CALIDA et al., 2000). A maior parte dos estudos com camundongos utiliza para análise histológica segmentos do nervo isquiático retirados o mais próximo de suas raízes. Nesses, são relatadas alterações histológicas que habitualmente são pouco detalhadas quanto a sua incidência. Frequentemente a quantificação é feita através de contagem de células inflamatórias / mm² na secções longitudinais do nervo isquiático. Esse número variou de 40 a 140 células inflamatórias / mm² (ZOU et al., 2000; ZHU J. et al., 1999; 2001; ZHU Y. 2001a; 2001b; 2002; BAO et al., 2002; 2003; DUAN et al., 2004; 2007; LU MO et al., 2007; BRUNN et al. 2008).

Há evidencia de que os camundongos C57BL/6 são resistentes à indução de NAE por injeções de proteína P2 e mielina de nervo periférico bovino (MNPB) que são comumente usadas para indução em outros animais. Foi comparada a susceptibilidade de diferentes linhagens de camundongos à NAE usando a proteína P2. Verificou-se que os camundongos SJL desenvolveram déficits neurológicos, enquanto BALB/C, CBA e C57BL/6 foram resistentes (TAYLOR e HUGHES, 1985). A NAE pode ser induzida em camundongos SJL/J com MNPB associada à AFC, mas também aqui se observou um comprometimento do SNP menos intenso que o encontrado em ratos Lewis (ROSTAMI et al; 1990). Os sinais clínicos da NAE induzida em camundongos SJL/J imunizados com MNPB, AFC e TP, associados ou

não a IL-12 foram estudados. Observou-se que esses sinais foram mais precoces (sinais iniciais 2 dias antes) e intensos no grupo que recebeu IL-12 e que a TP aumentou a intensidade e duração dos sinais clínicos (CALIDA et al., 2000). Em nosso estudo, o uso da lectina KM⁺ (Artin M) objetivou um aumento na produção de IL-12 (PANUNTO-CASTELO et al., 2001; PEREIRA-DA-SILVA; ROQUE-BARREIRA; VAN DAMME, 2008) e consequentemente a intensificação da doença. Entretanto, não verificamos diferença nos padrões que vinham sendo encontrados. Possíveis justificativas seriam: a dose utilizada poderia ter sido insuficiente para tal resposta; a forma de aplicação - aplicação local ou intravenosa eventualmente poderiam levar a respostas diferentes; ou ainda, a não obtenção da NAE com intensidade suficiente para diferenciar os grupos. Em diferentes modelos de doenças autoimunes órgão específicas o uso de TP como adjuvante complementar é habitual. A TP potencializa a resposta Th1-Th2, ativando citocinas e auxiliando na expressão de moléculas co-estimulatórias como CD28, resultando no aumento de células T (RYAN et al. 1998). O presente estudo comparou as formas de aplicação da TP no desencadeamento e evolução da doença. Não foram observadas diferenças entre os grupos de animais com aplicação intraperitoneal e intravenosa. A maioria dos estudos utiliza a via i.v. para aplicação, diferenciando nas doses e dias de injeção, porém a via i.p. também pode ser utilizada (ZHU J. et al., 2001; 2002; 2007; MILETIC et al., 2005; 2008; CALIDA et al., 2000).

Aspectos importantes para indução da NAE correspondem à sequência de peptídeos e à dose utilizada. Estudos em ratos Lewis demonstram a influência da dose de peptídeo inoculada na intensidade dos sinais clínico-histopatológicos da doença (HAHN et al., 1988). Foram utilizadas no presente estudo duas doses: 60 µg e 200 µg do peptídeo P0₁₈₀₋₁₉₉ e quando comparados os sinais clínicos, houve diferenças significativas a favor da dose maior. Os infiltrados endoneurais foram encontrados apenas em animais desse grupo. Entre os estudos que utilizam o modelo da NAE naquela linhagem de camundongo, as doses variam de 60µg a

200 µg do peptídeo. Alguns estudos utilizaram 60 µg do peptídeo P0₁₈₀₋₁₉₉ para indução da NAE. Os resultados encontrados foram discretos tanto na clínica, quanto na histologia semelhantes, portanto aos do presente estudo (ZOU et al., 2000; ZHU J. et al., 2001). O uso da mesma dose se associou tanto a paraparesia moderada quanto a grave, até paralisia (ZHU Y. et al., 2001a; 2001b; 2002). Em outros dois estudos, o mesmo grupo utilizou 120 µg do peptídeo - o dobro da dose dos estudos anteriores – e foram encontrados sinais menos intensos (DUAN et al., 2007; LU MO. et al., 2007). Em outro estudo, 200 µg do peptídeo P0₁₈₀₋₁₉₉ foram utilizados e os resultados divergiram dos estudos anteriores: apesar da dose mais alta, a doença desencadeada teve intensidade discreta, apresentando sinais clínico-neurológicos e histológicos sutis em 53% dos animais (MILETIC et al., 2005) tais como os encontrados no presente estudo.

Considerando a transitoriedade dos achados, a pouca intensidade das manifestações clínicas e que nem sempre pode ser documentada uma desmielinização, é possível que parte das manifestações clínicas no modelo hora estudado possam ser devidas a distúrbios funcionais da condução nervosa, desencadeados pela liberação de citocinas pelas células inflamatórias encontradas ao longo das raízes e dos nervos, mais do que a uma extensa desmielinização. Tais considerações têm como base a mesma possibilidade aventada para os primeiros dias de instalação da síndrome de Guillain-Barré no homem, nas quais ainda não haveria uma desmielinização generalizada, mas apenas um possível efeito funcional que até poderia estar relacionado aos infiltrados. Essa interpretação é aventada para explicar a resposta preferencial ao tratamento com imunoglobulina humana em altas doses ou plasmáfereze na primeira semana da síndrome. Após a instalação generalizada da desmielinização, a partir da segunda semana de instalação da síndrome, a resposta ao tratamento é menos evidente (RUDNICKI, S., 1992).

O modelo da NAE desencadeado nos camundongos C57Bl/6 caracterizou-se por discretos sinais clínicos e pouquíssimas alterações histopatológicas. Não observamos diferenças entre as formas de injeção da TP e entre as doses de peptídeos utilizadas, doses de 200µg de peptídeo se associaram a sinais clínicos e comprometimento histológico mais evidentes do que nos outros grupos. A correlação entre a evolução clínica da NAE e a presença de alterações histológicas ou células inflamatórias nos nervos periféricos, também foi observada em número reduzido de animais. Estudos futuros são necessários para melhor estabelecer a topografia das lesões e as alterações eletrofisiológicas evolutivas nesse modelo. A pouca intensidade das lesões e a variabilidade da sua intensidade são também indicativas da necessidade de serem estudadas cepas de camundongos mais susceptíveis à NAE como ocorre com ratos Lewis. A extensíssima quantidade de ferramentas biotecnológicas disponíveis no mercado e nos laboratórios de investigação para o estudo dos efeitos de doenças auto-imunes em camundongos justifica essa busca. Tais estudos poderiam permitir uma melhor compreensão das doenças auto-imunes do sistema nervoso periférico no homem e contribuir para que se encontrem tratamentos mais eficazes para tais doenças.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- O modelo de NAE em camundongos C57Bl/6 caracterizou-se por discretos sinais clínicos e poucas alterações histológicas.
- Não foram observadas diferenças nas manifestações clínicas e histológicas da NAE entre as formas de aplicação da TP.
- Entre as doses de peptídeos utilizadas, doses de 200µg de peptídeo se associaram a sinais clínicos e comprometimento histológico mais evidentes do que doses de 60 µg.
- Não foi observada influência da lecitina Artin M (KM⁺) nas manifestações clínicas e histológicas da NAE.
- Alterações histológicas ou presença de células inflamatórias no nervo isquiático e nas raízes L3-L6 foram observadas em número reduzido de animais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS A. K. e LICHTMAN A. H. **Imunologia celular e molecular**. 5ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005 – 2ª reimpressão.

ARCHELOS, J. J.; MAURER, M.; JUNG, S.; TOYKA, K.V.; HARTUNG, H.P. Suppression of experimental allergic neuritis by an antibody to the intercellular-adhesion molecule Icam-1. **Brain**, v. 116, n. 5, p.1043-1058, Out. 1993.

ASBURY, A. K.; ARNASON, B. G.; KARP, H. R.; MCFARLIN, D. E. Criteria for diagnosis of Guillain-Barré syndrome. **Annals of Neurology**, v. 3, p. 565-566, 1978.

ASBURY, A. K.; CORNBLATH, D. R. Assessment of current diagnostic-criteria for Guillain-Barré Syndrome. **Annals of Neurology** , v. 27, p. S21-S24, 1990.

BAO, L.; LINDGREN, J. U.; VANDERMEIDE, P.; ZHU, W. S. LJUNGGREN H. G.; ZHU, J. The critical role of IL-12p40 in initiating, enhancing, and perpetuating pathogenic events in murine experimental autoimmune neuritis. **Brain Pathology**, v. 12, p. 420-429, 2002.

BAO, L.; LINDGREN, J. U.; ZHU, Y.; LJUNGGREN, H.G.; ZHU, J. Exogenous soluble tumor necrosis factor receptor type I ameliorates murine experimental autoimmune neuritis. **Neurobiology of disease**, v. 12, n. 1, p. 73-81, Fev. 2003.

BARON, P.; CONSTANTIN, G.; DANDREA, A.; PONZIN, D.; SCARPINI, E.; SCARLATO, G.; TRINCHIERI, G.; ROSSI, F.; CASSATELLA, M. A. Production of tumor necrosis factor and other proinflammatory cytokines by human mononuclear phagocytes stimulated with myelin P2 protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 10, p. 4414-4418, Mai 1993.

BEN-NUN, A.; YOSSEFI, S.; LEHMANN, D. Protection against autoimmune disease by bacterial agents. II. PPD and pertussis toxin as proteins active in protecting mice against experimental autoimmune encephalomyelitis. **J. Immunol.**, v. 23, p. 689-696, 1993.

BOLIN, L. M.; VERITY, A. N.; SILVER, J. E.; SHOOTER, E. M.; ABRAMA, J. S. Interleukin-6 production by Schwann cells and induction in sciatic nerve injury. **J. Neurochem.**, v. 64, p. 850-858, 1995.

BROSTOFF, S. W.; LEVIT, S.; POWERS, J. M. Induction of experimental allergic neuritis with a peptide from myelin P2 basic protein. **Nature**, v. 268, n. 5622, p. 752-753, 1977.

BROSTOFF, S. W.; POWERS, J. M.; WEISE, M. J. Allergic encephalomyelitis induced in guinea pigs by a peptide from the NH₂-terminus of bovine P2 protein. **Nature**, v. 285, n. 5760, p. 103-104, Mai. 1980.

BRUCK, W.; BRUCK, Y.; DIEDERICH, U.; FRIEDE, R.L. Dorsal root ganglia co cultured with macrophage: an in vitro model to study experimental demyelination. **Acta Neuropathol. Berl.**, v. 88, p. 459-464, 1994.

BRUCK, W. The role of macrophages in wallerian degeneration. **Brain Pathol.**, v. 7, p. 741-752, 1997.

BRUNN, A.; UTERMOHLEN, O.; CARSTOV, M.; RUIZ, M. S.; MILETIC, H.; SCHLUTER, D.; DECKERT, M. CD⁴ T cells mediate axonal damage and spinal cord motor neuron apoptosis in murine P0 106-125 induced experimental autoimmune neuritis. **The American Journal of Pathology**, v. 173, p. 93-105, 2008.

CALIDA, D.M.; KREMLEV S.G.; ROSTAMI A. Experimental allergic neuritis in SJL/L mouse: induction of severe and reproducible disease with bovine peripheral nerve myelin and pertussis toxin with or without interleukin-12. **Journal of Neuroimmunology**, v. 107, p. 1-7, 2000.

CASPI, R. R.; SILVER, P. B.; CHAN, C. C.; SUN, B.; AGARWAL, R. K., WELLS, J.; ODDO, S.; FUJINO, Y.; NAJAFIAN, F.; WILDER, R. L. Genetic susceptibility to experimental autoimmune uveoretinitis in the rat is associated with an elevated Th1 response. **J. Immunol.**, v. 157, p. 2668, 1996.

DEIBLER, G. E.; MARTENSON, R.E.; KIES, M. W. **Prep. Biochem.**, v. 2, p. 139-165, 1972.

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

DUAN, R.S.; ZHANG, M. X.; MIX, E.; QUEZADA, H. C.; ADEM, A.; ZHU, J. IL-18 deficiency inhibits both Th1 and Th2 cytokine production but not the clinical symptoms in experimental autoimmune neuritis. **Journal Neuroimmunology**, v. 183, p. 162-167, 2007.

FRANKO, M. C.; KOSKI, C. L.; GIBBIS, C. L.; MCFARLIN, D. E. GAJDUSEL, D. C. Monoclonal antibody specific for myelin glycoprotein P0: Derivation and characterization. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 79, p. 3618-3622, 1982.

FREEMAN, G. J.; LOMBARD, D.B.; GIMMI, C.D.; BROD, S. A.; LEE, K.; LANING, J.C.; HAFLER, D. A.; DORF, M. E.; GRAY, G. S.; REISER, H. CTLA-4 and CD-28 mRNA are coexpressed in most T cells after activation. Expression of CTLA-4 and CD-28 mRNA does not correlate with the pattern of lymphokine production. **J. Immunol.**, v. 149, p. 3795-3801, 1992.

GASSER, D. L.; NEWLIN, C. M.; PALM, J.; GONATAS, N. K. Genetic control of susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis in rats. **Science**, v. 181, p. 872-873, 1973.

GOLD, R.; TOYKA, K. V.; HARTUNG, H. P. Synergistic effect of IFN gamma and TNF alpha on expression of immune molecules and antigen presentation by Schwann cells. **Cellular Immunology**, v. 165, n. 1, p. 65-70, Out. 1995.

GOLD, R.; HARTUNG, H. P.; TOYKA, K. V. Animal models for autoimmune demyelinating disorders of the nervous system. **Molecular Medicine Today**, v. 6, p. 88-91, Feb. 2000.

GREENFIELD, S.; BROSTOFF, S.; EYLAR, E. H.; MORELL, P. Protein composition of myelin of the peripheral nervous system. **J. Neurochem.**, v. 20, p. 1207-1216, 1973.

GREENFIELD, S.; BROSTOFF, S.; HOGAN, E. L. Characterization of the basic proteins from rodent peripheral nerves system myelin. **Journal of Neurochemistry**, v. 34, n. 2, p. 453-455, Feb. 1980.

HAFER-MACKO, C. E.; SHEIKH, K. A.; LI, C. Y.; HO, T. W.; CORNBLATH, D. R.; McKHANN, G. M.; ASBURY, A. K.; GRIFFIN, J. W. Immune attack on the Schwann cell surface in acute inflammatory demyelinating polyneuropathy. **Annals of Neurology**, v. 39, n. 5, p. 627-637, Mai. 1996a.

HAFER-MACKO, C. E.; HSIEH, S.T.; LI, C. Y.; HO, T. W.; SHEIKH, K. A.; COMBLATH, D. R.; McKHANN, G. M.; ASBURY, A. K.; GRIFFIN, J. W. Acute motor axonal neuropathy: an antibody-mediated attack on axolemma. **Annals of Neurology**, v. 40, p. 635-644, 1996b.

HAHN, A. F.; FEASBY, T. E.; GILBERT, J. J. Blood-nerve barrier studies in experimental allergic neuritis. **Acta Neuropathologica (Berl)**, v. 68, n. 2, p. 101-109, 1985.

HAHN, A. F.; FEASBY, T. E.; STEELE, A.; LOVGREN, D. S.; BERRY, J. Demyelination and axonal degeneration in Lewis rat experimental allergic neuritis depend on the myelin dosage. **Laboratory Investigation**, v. 59, n. 1, p. 115-125, Jul. 1988.

HAHN, A. F.; FEASBY, T. E.; WILKIE, L.; LOVGREN, D. S.; P2 peptide induced experimental allergic neuritis – A model to study axonal degeneration. **Acta Neuropathologica**, v. 82, n. 1 p. 60-65, 1991.

HAHN, A. F. Experimental allergic neuritis (EAN) as a model for the immune-mediated demyelinating neuropathies. **Revue Neurologique**, v. 152, n. 5, p. 328-332, Mai. 1996.

HARTUNG, H. P.; SCHAFER, B.; FIERZ, W.; HEININGER, K.; TOYKA, K. V. Ciclosporin A prevents P2 T cell line-mediated experimental autoimmune neuritis (AT-EAN) in rat. **Neuroscience Letters**, v. 83, p. 195-200, 1987.

HARTUNG H. P.; SCHAFER, B.; VAN DER MEIDE, P. H.; FIERZ, W.; HEININGER, K.; TOYKA, K. V. The role of interferon gamma in the pathogenesis of experimental autoimmune disease of the peripheral nervous system. **Annals of Neurology**, v. 27, n. 3, p. 247-257, Mar. 1990.

HARTUNG, H. P.; POLLARD, J. D.; HARVEY, G. K.; TOYKA, K. V. Immunopathogenesis and treatment of the Guillain-Barré syndrome – Part I e II **Muscle Nerve**, v. 18, n. 2, p. 137-164, Fev. 1995.

HARTUNG, H. P.; KIEFER, R.; GOLD, R.; TOYKA, K. V. Autoimmunity in the peripheral nervous system. **Bull. Clin. Neurol.**, v. 5, p. 1-45, 1996.

HARVEY, G. K.; POLLARD, J. D. Patterns of conduction impairment in experimental allergic neuritis. An electrophysiological and histological study in the rabbit. **Journal of Neurological Science**, v. 81, p. 215-225, 1992.

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

HUANG, W.; NA, L.; FIDEL, P.L.; SCHWARZENBERGER, P. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-Candida albicans host defense in mice. **J. Infect. Dis.**, v. 190, p. 624, 2004.

HUGHES, R. A.; POWEL, H. C. Experimental allergic neuritis: demyelination induced by P2 alone and non-specific enhancement by cerebroside. **Journal of Neurophatology and Experimental Neurology**, v. 43, p. 154-161, 1984.

JASINSKI, M.; WIEKIEWIEZ, J.; RUGGIERO, I.; PITUCH-NOWOROLSKA, A.; ZEMBALA, M. Isotype-specific regulation of MHC class II gene expression in human monocytes by exogenous and endogenous tumor necrosis factor. **J. Clin. Immunol.**, v. 15 (4), p. 185-193, 1995.

JELINEK, D. F.; BRAATEN, J.K. Role of IL-12 in human B lymphocyte proliferation and differentiation. **J. Immunol.**, v. 154, p. 1606-1613, 1995.

KADLUBOWSKI, M.; HUGHES, R. A. Identification of the neuritogen for experimental allergic neuritis. **Nature**, v. 277, p. 140-141, 1979.

KIEFER, R.; KIESEIER, B. C.; STOLL, G.; HARTUNG, H. P. The role of macrophages in immune-mediated damage to the peripheral nervous system. **Progress in Neurobiology**, v. 64, n. 2, p. 109-127, Jun. 2001.

KING RH, CRAGGS RI, GROSS ML, TOMPKINS C, THOMAS PK. Suppression of experimental allergic neuritis by Cyclosporin-A. **Acta Neuropathology**, v. 59, n. 4, p. 262-268, 1983.

KONAT, G. W.; WIGGINS, R. C. Effect of reactive oxygen species on myelin membrane proteins. **Journal of Neurochemistry**, v. 45, n. 4, p. 1113-1118, Oct. 1985.

KOLLS, J.K.; LINDEN, A. Interleukin-17 family members and inflammation. **Immunity**, v.21, p. 467-476, 2004.

LININGTON, C.; LASSMANN, H.; OZAWA, K.; KOSIN, S.; MONGAN, L. Cell-Adhesion molecules of the immunoglobulin supergene family as tissue-specific autoantigens – Induction of experimental allergic neuritis (EAN) by P0 protein-specific T cell lines. **European Journal of Immunology**, v. 22, n. 7, p. 1813-1817, Jul. 1992.

LU, M.O.; DUAN, R. S.; QUEZADA, H. C.; CHEN, G. Z.; MIX, E.; JIN, T.; YANG, X.; LJUGGREN, H. G.; ZHU, J. Aggravation of experimental autoimmune neuritis in TNF alpha receptor 1 deficient mice. **Journal of Neuroimmunology**, v. 186, p. 19-26, 2007.

MASON, D. Genetic variation in the stress response: Susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis and implications for human inflammatory disease. **Immunol. Today**, v. 12, p. 57-60, 1991.

McCARRON, R. M.; WANG, L.; RACKE, M. K.; MCFARLIN, D.; SPATZ, M. Cytokine-regulated adhesion between encephalitogenic T lymphocytes and cerebrovascular endothelial cells. **Journal of Neuroimmunology**, v. 43, n. 1-2, p. 23-30, Mar. 1993.

MILETIC, H.; UTERMÖHLEN, O.; WEDEKIND, C.; HERMANN, M.; STENZEL, W.; LASSMANN, H.; SCHLUTER, D.; DECKERT, M. P0 106-125 is a neuritogenic epitope of peripheral myelin protein P0 and autoimmune neuritis in C57Bl/6 mice. **Journal of Neurophatology and Experimental Neurology**, v. 64, n. 1, p. 66-73, Jan. 2005.

MILNER, P.; LOVELIDGE, C. A.; TAYLOR, W. A.; HUGHES, R. A. P0 myelin protein produces experimental allergic neuritis in Lewis rats. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 79, p. 275-285, 1987.

MIYAMOTO, K.; MYAKE, S.; SCHACHENER, M. Heterozygous null mutation of myelin P0 protein enhances susceptibility to autoimmune neuritis targeting P0 peptide. **European Journal Immunology**, v. 33, p. 656-665, 2003.

MOORE, M. J.; SINGER, D. E.; WILLIAMS, R. M. Linkage of severity of experimental allergic encephalomyelitis to the rat major histocompatibility locus. **Journal Immunology**, v. 124, p. 1815-1820, 1980.

MOSLEY, K.; CUZNER, M.L. Receptor-mediated phagocytosis of myelin by macrophages and microglia: effect of opsonization and receptor blocking agents. **Neurochem. Res.**, v. 21, p. 481-487, 1996.

MURWANI, R.; HODGKINSON, S.; ARMATI, P. Tumor necrosis factor alpha and IL-6 mRNA expression in neonatal Lewis rat Schwann cells and a neonatal rat Schwann cell line following interferon- γ . **J. Neuroimmunol.**, v.71, p. 65-71, 1996.

NAKANISHI, K.; YOSHIMOTO, T.; TSUTSUI, H.; OKAMURA, H. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. **Annu. Rev. Immunology**, v. 19, p. 423-474, 2001.

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

O'GARRA, A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. **Immunity**, v. 8, p. 275-283, 1998.

OLEE, T.; POWERS, J. M.; BROSTOFF, S. W. A T cell epitope for experimental allergic neuritis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 19, p. 167-173, 1988.

OLEE, T.; POWELL, H. C.; BROSTOFF, S. W. New minimum length requirement for a T cell epitope for experimental allergic neuritis. **Journal of neuroimmunology**, v. 27, p. 187-190, 1990.

PANUNTO-CASTELO, A.; SOUZA, M.A.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; SILVA, J.S. KM+, a lectin from *Artocarpus integrifolia*, induces IL-12 p40 production by macrophages and switches from type 2 to type 1 cell-mediated immunity against *leishmanis major* antigens, resulting in BALB/c mice resistance to infection. **Glycobiology**, v.11 (12), p.1035-1042, 2001.

PEERS, S. H.; DUNCAN, G. S.; FLOWER, R. J.; BOLTON, C. Endogenous corticosteroids modulate lymphoproliferation and susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis in the Brown Norway rat. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, v. 106, p. 20-24, 1995.

PELIDOU, S.H.; ZOU, L.P.; DERETZI, G.; ONIDING, C.; MIX, E.; ZHU, J. Enhancement of acute phase and inhibition of chronic phase of experimental autoimmune neuritis in Lewis rats by intranasal administration of recombinant mouse interleukin 17: potential immunoregulatory role. **Experimental Neurology**, v. 163, p. 165-172, 2000.

PENDER, M. P.; MCCOMBE, P. A. **Autoimmune neurological disease**. 1ª edição. Cambridge: Cambridge University press.

PEREIRA-DA-SILVA G.; ROQUE-BARREIRA M. C.; VAN DAMME E.J. 2008. Artin M: a rational substitution for the names artocarpin and KM+. **Immunology Letters**, v. 119, n. 1-2, p. 114-115, Jul. 2008.

POWELL, H. C.; BRAHENY, S. L.; HUGHES, R. A.; LAMPERT, P. W. Antigen specific demyelination and significance of the bystander effect in peripheral nerves. **American Journal of Pathology**, v. 114, p. 443-453, 1984.

RAINE, C. S.; BORNSTEIN, M. B. Experimental allergic neuritis. Ultrastructure os serum induced myelin aberrations in peripheral nervous system cultures. **Laboratory Investigation**, v. 40, p. 423-432, 1984.

RANI, P. G.; BACHHAWAT, K.; MISQUITH, S.; SUROLIA, A. Thermodynamic studies of saccharide binding to artocarpin, a B-cell mitogen, reveals the extended nature of its interaction with mannotriose [3, 6-di-o-(alpha-D-mannopyranosyl)-D-mannose]. **J. Biol. Chem.**, v.274, p. 29694-29698, 1999.

REDFORD, E. J.; HALL, S. M.; SMITH, K. J. Vascular changes and demyelination induced by the intraneural injection of Tumor-Necrosis-Factor. **Brain**, v. 118, p. 869-878, Ago. 1995.

REDFORD, E. J.; SMITH, K. J.; GREGSON, N. A.; DAVIES, M.; HUGHES, P.; GEARING, A. J. H.; MILLER, K.; HUGHES, R. A. C. A combined innibitor of matrix metalloproteinase activity and tumor necrosis factor- alpha processing attenuates experimental autoimmune neuritis. **Brain**, v. 120, n. 10, p. 1895-1905, Out. 1997.

ROBINSON, H. C.; ALLT, G.; EVANS, D. H. A study of the capacity of myelinated and unmyelinated nerves to induce experimental allergic neuritis. **Acta Neuropathologica**, v. 21, p. 99-108, 1972.

ROSEN, J. L.; BROWN, M. J.; HICKEY, W. F.; ROSTAMI, A. Early myelin lesions in experimental allergic neuritis. **Muscle Nerve**, v. 13, n. 7, p. 629-636, Jul. 1990.

ROSTAMI, A.; GREGORIAN, S. K.; BROWN, M. J.; PLEASURE, D. E. Induction of severe experimental autoimmune neuritis with a synthetic peptide corresponding to the 53-78 amino-acid-sequence of the myelin P2 protein. **Journal of Neuroimmunology**, v. 143, n. 2-3, p. 145-151, Dez. 1990.

ROSTAMI, A.; GREGORIAN, S. K. Peptide 53-78 of myelin P2 protein is a T cel epitope for the induction of experimental allergic neuritis. **Cellular Immunology**, v. 132, p. 433-441, 1991.

RUDNICKI, S.; VRIESENDORP, F.; KOSKI, C. L.; MAYER, R. F. Electrophysiologic studies in the Guillain-Barré syndrome: effects of plasma exchange and antibody rebound. **Muscle Nerve**, v. 15 (1), p. 57-62, 1992.

RYAN, M. L.; MCCARTHY, R.; RAPPUOLI, B.P.; MILLS, K. H. G.; Pertussis toxin potentiates Th1 e Th2 responses to co-injected antigen: adjuvant action is associates with enhance regulatory cytokine production and expression of the co-stimulatory molecules B7-1, B7-2 and CD28. **Int. Immunol.**, v. 10, p. 651, 1998.

SCHMIDT, B.; STOLL, G.; VANDERMEIDE, P.; JUNG, S.; HARTUNG, H. P. Transient cellular expression of gamma-interferon in myelin-induced and T cell line mediated experimental autoimmune neuritis. **Brain**, v. 115, p. 1633-1646, Dez. 1992.

SHIVE, C. L.; HOFSTETTER, L.; ARREDONDO, C.; SHAW, C.; FORSTHUBER, T. G. The enhance antigen-specific production of cytokines induced by pertussis toxin is due to clonal expansion of T cells and not to altered effector functions of long term memory cells. **Euro. J. Immunol.**, v. 30, p. 2422, 2000.

SMITH, M. E.; FORNO, L. S.; HOFMANN, W. W. Experimental allergic neuritis in the Lewis rat. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 38, p. 377-391, 1979.

STEINMAN, L.; SMITH, M. E.; FORNO, L.S. Genetic control os susceptibility to experimental allergic neuritis and the immune response to P2 protein. **Neurology**, v. 31, p. 950-954, 1981.

STEINMAN, R.M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 9, p. 271, 1991.

STOLL, G.; JANDER, S.; JUNG, S.; ARCHELOS, J.; TAMATANI, T.; MIYASAKA, M.; TOYKA, K. V.; HARTUNG, H. P. Macrophages and endothelial-cells express intercellular-adhesion molecule-1 in immune mediated demyelination but not in wallerian degeneration of the rat peripheral nervous system. **Laboratory Investigation**, v. 68, n. 6, p. 637-644, Jun. 1993.

SUN, B.; RIZZO, R. V.; SUN, S. H.; CHAN, C. C.; WIGGERT, B.; WILDER, R. L.; CASPI, R. R. Genetic susceptibility to experimental autoimmune uveitis involves more than a predisposition to generate a T helper 1 like or a T helper 2 like response. **J. Immunol.**, v. 159, p. 1004, 1997.

TAYLOR, W. A.; HUGHES, R. A. Experimental allergic neuritis induced in SJL mice by bovine P2. **Journal of Neuroimmunology**, v. 8, p. 153-157, 1985.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and its role in the generation of Th1 cells. **Immunol. Today**, v. 14, p. 335-338, 1995.

TRINCHIERI, G. Interleukin 12: a cytokine at the interface pf inflammation and immunity. **Adv. Immunol.**, v. 70, p. 83-243, 1998.

VANDENABEELE, P.; DECLERCQ, W.; BEYAERT, R.; FIERS, W. Two tumor necrosis factor receptors: structure and function. **Trends in Cell Biology**, v. 5, n. 10, p. 392-399, Out. 1995.

WAKSMAN, B. H.; ADAMS, R. D. Allergic neuritis: an experimental disease of rabbits induced by the injection of peripheral nerve tissue and adjuvants. **Journal of Experimental Medicine**, v. 102, n. 2, p. 213-236, Ago. 1955.

WAKSMAN, B. H.; ADAMS, R. D. A comparative study of experimental allergic neuritis in the rabbit, guinea pig, and mouse. **Journal of neuroimmunology**, v. 15, p. 293-332, 1956.

WARE, C.F.; CROWE, P. D.; VANARSDALE, T. L.; ANDREWS, J.L.; GRAYSON, M. H.; JERZY, R.; SMITH, C. A.; GOODWIN, R. G. Tumor necrose factor (TNF) receptor expression in T lymphocytes. Differential regulation of the type I TNF receptor during activation of resting and effector T cells. **J. Immunol.**, v. 147 (12), p. 4229-4238, 1991.

WOOD, J. G.; DAWSON, R. M. C. Some properties of major structural glycoprotein of sciatic nerve. **Journal of Neurochemistry**, v. 22, p. 627-630, 1974.

WOOD, J.C.; MCLAUGHLIN, B. J. The visualization of concanavalin-A binding sites in the interperiod line of rat sciatic nerve myelin. **J. Neurochem.**, v. 24, p. 233-235, 1975.

YU, S.; CHEN, Z.; MIX, E.; ZHU, S.W.; LJUNGGREN, H. G.; ZHU, J. Neutralizing antibodies to IL-18 ameliorate experimental autoimmune neuritis by counter-regulation of autoreactive Th1 responses to peripheral myelin antigen. **Journal Neurophatology Experimental Neurology**, v. 61, p. 614-622, 2002.

ZHU, J.; LINK, H.; WEERTH, S.; LININGTON, C.; MIX, E.; QIAO, J. The B cell repertoire in experimental allergic neuritis involves multiple myelin proteins and GM1. **J. Neurol. Sci.**, v. 125, p. 132-137, 1994a.

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

ZHU, J.; BAI, X. F.; MIX, E.; LINK, H. Cytocine dichotomy in peripheral nervous system influences the outcome of experimental allergic neuritis: Dynamics of mRNA expression for IL-1 beta, IL-6, IL-10, IL-12, TNF-alpha, TNF- beta, ando cytolysin. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 84, n. 1, p. 85-94, Jul. 1997.

ZHU, J.; MIX, E.; LINK, H. Cytokine production and the pathogenesis of experimental autoimmune neuritis and Guillain-Barré syndrome. **Journal of Neuroimmunology**, v. 84, n. 1, p. 40-52, Abr. 1998a.

ZHU, J.; ZOU, L. P.; BAKHIET, M.; MIX, E. Resistance and susceptibility to experimental autoimmune neuritis in Sprague-Dawley and Lewis rats correlate with different levels of autoreactive T and B cell responses to myelin antigens. **Journal of Neuroscience Research**, v. 54, n. 3, p. 373-381, Nov. 1998b.

ZHU, J.; NENNESMO, I.; DENG, G. M. Induction of experimental autoimmune neuritis in CD4-8-C57Bl/6 mice. **Journal Neuroimmunology**, v. 94, p. 196-203, 1999.

ZHU, J.; ZOU, L.P.; ZHU, S.W.; MIX, E.; LJUNGGREN, H. G.; Citotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) blockade enhances incidence and severity of experimental autoimmune neuritis in resistant mice. **Journal of Neuroimmunology**, v. 115, p. 111-117, 2001.

ZHU, Y., LJUNGGREN, H.G., MIX, E. CD28-B7 costimulation: a critical role for initiation and development of experimental autoimmune neuritis in C57BL/6 mice. **Journal Neuroimmunology**, v. 114, p. 114-121, 2001a.

ZHU, Y.; LJUNGGREN, H. G.; MIX, E.; LI, H. L.; VAN DER MEIDE, P.; ELHASSAN, A. M.; WINBLAD, B.; ZHU, J. Suppression of autoimmune neuritis in IFN gamma receptor deficient mice. **Experimental Neurology**, v. 169, p.472-478, 2001b.

ZHU, Y.; BAO, L.; ZHU, S. CD4 e CD8 T cells, but not B cells, are critical to the control of murine experimental autoimmune neuritis. **Experimental Neurology**, v. 177, p. 314-320, 2002.

ZOU, L.P.; LJUNGGREN, H.G., LEVI, M. P0 protein peptide 180-199 together with pertussis toxin induces experimental autoimmune neuritis in resistant C57BL/6 mice. **Journal Neuroscience research**, v. 62, p. 717-721, 2000.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)