

HELOÍSA HELENA RUOCCO

**RESPOSTA IMUNE EM RATOS COM ENCEFALOMIELITE
ALÉRGICA EXPERIMENTAL AGUDA TRATADOS COM A
SUBSTÂNCIA P**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual
de Campinas para obtenção do título de Doutora em
Clínica Médica, área de Clínica Médica*

Orientador: Prof. Dr. GILBERTO DA ASSUNÇÃO FERNANDES

CAMPINAS

2000

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

R876r

Ruocco, Heloisa Helena

Resposta imune em ratos com encefalomielite alérgica experimental aguda tratados com a substância P / Heloisa Helena Ruocco. Campinas, SP : [s.n.], 2000.

**Orientadores : Gilberto da Assunção Fernandes, Salomon Levy
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.**

1. Linfócitos. 2. Auto-imune. 3. Células Killer. I. Gilberto da Assunção Fernandes. II. Salomon Levy. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado

Orientador(a): Prof. Dr. Gilberto D'Assunção Fernandes

Gilberto A. Fernandes

Membros:

1. Profa. Dra. Margaret de Castro

Margaret de Castro

2. Prof. Dr. José Antunes Rodrigues

J. A. Rodrigues

3. Prof. Dr. Sigisfredo Luis Brenelli

S. L. Brenelli

4. Prof. Dr. Francesco Langone

F. Langone

Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 15/12/00

Dedicatória

Aos meus pais, alicerces de amor, inabalável crença e companheirismo infatigável de todos os dias, que me permitem sonhar e materializar o idealizado.

AGRADECIMENTOS

Esta tese faz parte de um aprendizado que extrapola a minha formação científica, estendendo-se ao plano filosófico, com grande amadurecimento humano e cultural. Várias pessoas e lugares compuseram essa minha formação e me estão fortemente atados. Assim, expresso todo o meu agradecimento para:

Dr. Gilberto da Assunção Fernandes, professor do departamento de Patologia Clínica da UNICAMP, por ter-me dado a oportunidade de trilhar o fascinante caminho da neuroimunologia, que me abriu as portas para o laboratório e a pesquisa experimental.

Dr. Salomon Levi, pesquisador do departamento de Imunologia e Hematologia do “Hôpital de HautPierre”, em Strasbourg, e meu co-orientador de tese, exemplo de dedicação e versatilidade, que me orientou fundamentalmente na prática desta pesquisa, participando diariamente do trabalho de bancada na quantificação das células NK, mais do que um mestre, quase como um pai que dá a mão a um filho durante seus primeiros passos.

Dra. Suzanne Lemieux, pesquisadora na área de Imunologia do “Institut Armand-Frappier” do IRNS (“Institut National de la Recherche Scientifique”) de Quebec que, mesmo durante a minha curta permanência em Montreal, com a simplicidade e didatismo dos grandes mestres, aportou-me muito conhecimento sobre imunologia, metodologia científica e profissionalismo. Esse contato influenciou muitas das conclusões deste estudo e fez renascer o meu entusiasmo pela pesquisa.

Dr. Pierre Bischoff, pesquisador na área de cancerologia experimental e de radiobiologia, junto ao instituto Inserm da “Université Louis Pasteur de Strasbourg” (ULP) pela utilização do seu laboratório, assim como pelo seu excelente suporte técnico-científico, grande incentivador da minha ida ao Canadá.

Aos pesquisadores Antoine Depaulis e Izzie Jacques Namer, integrantes da Unidade de Pesquisa 398 do Inserm (“Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale”) e “Institut de Physique Biologique”, respectivamente, onde grande parte deste

trabalho de tese foi realizado e aos quais reconheço, não apenas o acolhimento, mas também a ajuda financeira para o início deste estudo.

Aos médicos pesquisadores Dr. Christian Marescaux, chefe do serviço de Neuro-epilepsia da “Faculté de Médecine de Strasbourg” e diretor da Unidade 398 do Inserm, e Dr. D. Grucker, diretor do “Institut de Physique Biologique”, pelo suporte financeiro de grande parte deste trabalho.

Aos estudantes Vincent Holl e David Coehlo pela assistência técnica e aprendizado em cultura celular, colaboradores fundamentais neste trabalho.

À Dra. B. Uring-Lambert, médica do departamento de Imunologia e Hematologia do “Hôpital de HautPierre”, em Strasbourg, pela utilização de seu laboratório e assistência técnica em citometria de fluxo.

Aos técnicos P. Bich-Thuy, J. Steibel, B. Bucher e Lam, pela assistência em diferentes técnicas laboratoriais.

Aos pesquisadores Dra. Braden Berger e J.L.Loeffler, pela utilização dos seus laboratórios para a quantificação das dosagens hormonais deste trabalho.

À Any Boeher e Ramla Bennmaar, pela amizade e companheirismo no laboratório, principalmente nos dias difíceis.

Aos colegas do laboratório do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da Unicamp, Roberto César Stahl, Fernando Guimarães, Paulo César Granado e José Marialva, pelo aprendizado de várias técnicas laboratoriais e companheirismo de todos os dias.

Aos membros da banca, Dra. Margaret de Castro, pelas inúmeras informações técnicas a mim fornecidas durante a minha estadia em Strasbourg, através do prático correio-eletrônico; ao Dr. Francesco Langone, pela ajuda na escolha das fotos de cortes histológicos deste trabalho; ao Dr. José Antônio Rocha Gontijo, pelo apoio e auxílio quanto à minha solicitação de bolsa de estudos para a realização desta pesquisa.

Aos estatísticos Andrea Ferreira e Helymar Machado que, juntamente com o auxílio do Dr. Gilberto da Assunção Fernandes, me ajudaram na elaboração dos dados estatísticos desta tese.

Aos integrantes do Apoio Didático da FCM, a secretária Renata Maia, pelas inúmeras intercessões junto aos órgãos administrativos; à professora Maria José Teodora Carreira Rey, pela configuração desse manuscrito nas normas científicas nacionais vigentes; e Alexandro Vieira Jacob, pelo editoramento desta tese.

Aos meus anfitriões rotarianos em Strasbourg, Maxime e Monique Guillarme, Pierre e Andrea Haas, pela excepcional acolhida em suas casas e no seio de suas famílias, pelo aprendizado histórico da França e, em particular, da cultura “strasbourgeoise”. Testemunho de cuidado, carinho e amizade para toda a vida.

Aos demais amigos François Munier, Ludovic Doyennette, Ione Bartol, Caroline Arisfon, Lucia Altucci, Maher Abu Eid, Marie-Claude e Fabien, pelo carinho, amizade e companheirismo do dia-a-dia.

Às cidades de Campinas, alicerce de vida e Strasbourg, de história, facetas complementares de uma mesma jornada.

Reitero, também, meu profundo respeito aos pacientes de Esclerose Múltipla, com os quais tive contato e que me fizeram revalidar, na dor de seus sofrimentos, os conceitos da vida.

Esta tese foi realizada com as seguintes colaborações:

**Disciplina de Fisiologia do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental,
UNICAMP**

Heloísa Helena Ruocco

Gilberto da Assunção Fernandes

INSERM U-398, Strasbourg

Antoine Depaulis

Christian Marescaux

“Institut de Physique Biologique”, Strasbourg

Izzie Jacques Namer

D. Grucker

Service d’Imunologie et Hematologie de l’Hôpital de Hautepierre

Salomon Levy

B. Uring-Lambert

Laboratoire de Cancérologie Expérimentale et de Radiobiologie

“Université Louis Pasteur de Strasbourg” (ULP)

Pierre Bischoff

Vincent Holl

David Coehlo

**Fundação Rotariana Internacional, com auxílio através de bolsa de estudos
de 1 ano.**

Fundação CAPES, com auxílio através de bolsa de estudos de 6 meses.

“Disso podemos ter certeza, que a ciência, obedecendo à lei da humanidade, sempre trabalhará para estender as fronteiras da vida.”

**Louis Pasteur,
inaugurando o Instituto Pasteur em 1888.**

	PÁG.
RESUMO	xxix
1. INTRODUÇÃO	33
1.1. Conceitos Gerais.....	35
1.2. Esclerose Múltipla (EM): História natural de uma síndrome auto-imune....	38
1.2.1. Conceitos gerais.....	38
1.2.2. Immunopatologia.....	40
1.2.3. Anomalias da imunidade humoral.....	41
1.2.4. Anomalias da imunidade celular.....	42
1.2.5. Imunidade antiviral e EM.....	42
1.2.6. Mecanismos imunológicos da desmielinização.....	43
1.3. Encefalomielite Alérgica Experimental.....	44
1.3.1. Histórico.....	44
1.3.2. Fisiopatologia da EAE.....	44
1.3.3. Aspectos clínicos e patológicos da EAE.....	51
2. OBJETIVOS	53

3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	57
3.1. Animais.....	59
3.2. Canulação Intracerebroventricular.....	59
3.3. Preparação da Proteína Básica da Mielina (PBM).....	65
3.4. Indução da EAE.....	65
3.5. Tratamento.....	66
3.6. Sinais clínicos na EAE.....	69
3.7. Avaliação por citometria de fluxo de 2 cores das subpopulações de células T.....	69
3.8. Ensaio de citotoxicidade NK.....	73
3.9. Análises Hormonais.....	73
3.9.1. Ensaio de corticosterona sérica.....	74
3.9.2. Ensaio de Hormônio Adrenocorticotrófico sérico (ACTH).....	74
3.9.3. Ensaio de Arginina Vasopressina (AVP).....	74
3.10. Análise Histológica.....	74
3.11. Análise estatística dos resultados.....	75
4. RESULTADOS.....	77
4.1. Evolução clínica dos animais com EAE.....	79
4.2. Achados histopatológicos.....	87

4.3. Atividade Citotóxica NK em baços de ratos normais e com EAE.....	97
4.4. Análise da citometria de fluxo de células NK e subtipos T CD3 ⁺ , CD4 ⁺ , CD8 ⁺ e NKT nos baços de ratos normais e com EAE.....	101
4.5. Análises hormonais.....	115
5. DISCUSSÃO.....	123
5.1. Da evolução clínica aos sinais histopatológicos.....	125
5.2. Modulação do eixo HPA.....	126
5.3. Estresse inflamatório como fator de mudanças no peso corporal.....	131
5.4. Imunidade Celular.....	132
6. CONCLUSÕES.....	137
7. SUMMARY.....	141
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	145
9. ANEXOS.....	163

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	artrite adjuvante
ACF	adjuvante completo de Freund
ACTH	hormônio adrenocorticotrófico
APC	célula apresentadora de antígenos
AVP	arginina vasopressina
BHE	barreira hematoencefálica
C	complemento
Ca ⁺⁺	cálcio
CD	marcador de superfície celular
cpm	contagem por minuto
CO ₂	dióxido de carbono
CRF-41	fator liberador da corticotrofina
CRH	hormônio liberador da corticotrofina
EAE	Encefalomielite Alérgica Experimental
EAEAnS	grupo com EAE injetado i.c.v com antagonista da SP e salina após
EAEAnSP	grupo com EAE injetado i.c.v.com antagonista da SP e Substância P após
EAEc	grupo com EAE controle
EAES	grupo com EAE injetado i.c.v.com salina
EAESP	grupo com EAE injetado i.c.v.com Substância P
EDTA	sal dissódico do ác. etilenodinitrilotetracético
EM	Esclerose Múltipla
E.P.M.	erro padrão da média

F	Fisher
Fe ⁺⁺	ferro
FITC	isotiocianato de fluoresceína
g	grama
G	“gauge” (diâmetro)
GABA	ácido gama-aminobutírico
h	hora
HCl	ácido clorídrico
HE	hematoxilina-eosina
HHA	eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
HLA	antígeno de histocompatibilidade leucocitário
ICAM-1	molécula de adesão celular intercelular-1
i.c.v.	intracerebroventricular
IFN- γ	“interferon- γ ”
Ig	imunoglobulina
IL	interleucina
I.O.P.S.	isentos de organismos patogênicos específicos
i.p.	intraperitoneal
kDa	kilodalton
Kg	kilograma
LFA	antígeno associado à função leucocitária
LT	linfócito T
LwN	grupo Lewis normal
M	molar

mg	miligrama
MHC	Complexo de Histocompatibilidade Principal
min	minuto
mm	milímetro
mM	milimolar
NA	noradrenérgica
Na ₂ CrO ₄	cromato de sódio
NK	“natural killer” (também designada como CD3 ⁺ NKR-P1 ⁺)
NKac	atividade citotóxica NK
NK-1	neurocinina
NKR-P1	receptor de neurocinina
NKT	células da linhagem celular T NKR-P1 $\alpha\beta$ TCR ⁺ (ou CD3 ⁺ NKR-P1 ⁺)
nmol	nanomol
NO	óxido nítrico
NOD	obeso não diabético
PVN	núcleo paraventricular do hipotálamo
n°	número
OVL \bar{T}	órgão vascular da lâmina terminal
PBM	proteína básica da mielina
PE	ficoeritrina
PG	prostaglandina
PPD	derivado purificado da proteína
RIA	radioensaio
RP 67580	receptor peptidérgico

RPMI-1640	meio mínimo de cultura
SD	desvio padrão
SDS	duodecil sulfato de sódio
SmS	grupo simulado com injeção i.c.v. de salina
SmSP	grupo simulado com injeção i.c.v. de SP
SNA	sistema nervoso autônomo
SNC	sistema nervoso central
SNP	sistema nervoso parassimpático
SP	Substância P
TCR	receptor de célula T
TGF β 1	fator transformador do crescimento- β 1
Th	T auxiliar
TNF- α	fator de necrose tumoral- α
\bar{V}	volume
VCAM-1	molécula de adesão celular vascular
VLA-4	antígeno tardio-4
YAC-1	linhagem celular de linfoma murino
μ l	microlitro
$^{\circ}$ C	graus Celsius
6-OHDA	6 hidroxidopamina

LISTA DE TABELA

	PÁG.
Tabela 1: Escore clínico de ratos Lewis machos com EAE nos diferentes grupos experimentais.....	83

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1A: Procedimento cirúrgico para implantação de cânula intracerebroventricular, notando-se, em detalhe, o local de implantação, segundo medidas estereotáticas precisas, tendo como referência o bregma.....	61
Figura 1B: Aparelho estereotático e colocação da cânula intracerebroventricular para tratamento.....	63
Figura 2: Injeção de salina, SP ou antagonista da SP, realizada com microbomba de infusão, através da cânula guia.....	67
Figura 3: Marcação, por imunofluorescência, dos esplenócitos de ratos. Em A: Imagem do painel representa as células CD4 ⁺ e CD8 ⁺ . Em B: Imagem do painel representa as células CD3 ⁺ , NK e NKT.....	71
Figura 4A: Evolução dos pesos corporais de ratos normais e com EAE-controle.....	79
Figura 4B: Evolução dos pesos corporais de ratos com EAE tratados com salina, substância P, antagonista da SP + salina, antagonista da SP + SP.....	81
Figura 5: Rato com EAE com sinais clínicos leves, mostrando, em detalhe, a plegia da cauda, patas traseiras edemaciadas, mas sem atrofia muscular.....	85
Figura 6: Rato com EAE com sinais clínicos graves, mostrando, em detalhe, a plegia da cauda e a paraplegia, marcada por intensa atrofia muscular e edema de patas traseiras.....	85

Figura 7: Cortes histopatológicos de ratos controles e com EAE no pico dos sinais clínicos da doença.

Em A: Corte histológico de cérebro de rato normal, mostrando as margens ventriculares do ventrículo lateral sem infiltrado inflamatório. Em detalhe, a presença do plexo coróide.

Em B: Corte histopatológico de cérebro de rato com EAE, mostrando as margens ventriculares do ventrículo lateral com infiltrado inflamatório leve. Nota-se a presença desse infiltrado periventricular e perivascular.

Em C: Corte histopatológico de cérebro de rato com EAE, mostrando, em detalhe, um infiltrado inflamatório periventricular e outro perivascular.

Em D: Corte histopatológico de cérebro de rato com EAE, mostrando as margens ventriculares do ventrículo lateral com infiltrado inflamatório intenso difusamente distribuído. As setas mostram as áreas mais acometidas (periventricular e perivascular). Nota-se, também, uma destruição da citoarquitetura normal do tecido, em função do intenso processo inflamatório.

Em E: Corte histopatológico de cerebelo de rato com EAE, mostrando infiltrado inflamatório intenso difusamente distribuído.

Em F: Corte histológico da medula de rato normal, sem infiltrado inflamatório. Em detalhe, o canal central da medula.

Em G: Corte histopatológico da medula de rato com EAE, mostrando infiltrado inflamatório leve.

Em H: Corte histopatológico de medula de rato com EAE, mostrando infiltrado inflamatório intenso, com alteração da citoarquitetura tecidual.....87

Figura 8:	Atividade NK em ratos Lewis machos com encefalomielite alérgica experimental (EAE).....	99
Figura 9:	Porcentagem de células T CD3 ⁺ em ratos Lewis machos com encefalomielite alérgica experimental (EAE).....	103
Figura 10:	Porcentagem de células T CD4 ⁺ em ratos Lewis machos com encefalomielite alérgica experimental (EAE)	105
Figura 11:	Porcentagem de células T CD8 ⁺ em ratos Lewis machos com encefalomielite alérgica experimental (EAE)	107
Figura 12:	Razões de células T CD4/CD8 em ratos Lewis machos com encefalomielite alérgica experimental (EAE).....	109
Figura 13:	Porcentagem de células CD3 ⁻ NKRP-1 ⁺ em ratos Lewis machos com encefalomielite alérgica experimental (EAE).....	111
Figura 14:	Porcentagem de células CD3 ⁺ NKRP-1 ⁺ em ratos Lewis machos com encefalomielite alérgica experimental (EAE).....	113
Figura 15:	Nível de ACTH em ratos Lewis machos com encefalomielite alérgica experimental (EAE).....	117
Figura 16:	Nível de corticosterona em ratos Lewis machos com encefalomielite alérgica experimental (EAE).....	119
Figura 17:	Nível de AVP em ratos Lewis machos com encefalomielite alérgica experimental (EAE).....	121

RESUMO

Centralmente aplicada, a Substância P (SP) interage com o sistema nervoso autônomo (SNA) e com o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA). Sabendo-se que esses sistemas modulam a função imune inata e têm sido implicados na resposta inflamatória associada com doenças auto-imunes, os efeitos da administração de SP intracerebroventricular (i.c.v.) na quantificação de linfócitos e na atividade citotóxica “natural killer” (NK) de células esplênicas foram estudados na Encefalomielite Alérgica Experimental (EAE), um modelo de estresse inflamatório crônico.

Neste trabalho investigou-se a influência da SP e do seu antagonista sobre as subpopulações celulares CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD3⁻NKR-P1⁺, CD3⁺NKR-P1⁺, quantificadas por citometria de fluxo e a atividade imunológica citotóxica NK, obtida por ensaio de liberação de cromo radioativo Cr⁵¹, no curso desse processo inflamatório.

A possibilidade de avaliar a atividade do eixo HHA nessa doença foi verificada pelas dosagens hormonais séricas do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e corticosterona, e da arginina vasopressina (AVP), na eminência média.

Os resultados mostraram que na EAE houve um aumento no baço nos subtipos celulares CD3⁺ (64,2 ± 0,8 %), CD4⁺ (59,6 ± 0,6 %), CD8⁺ (14,5 ± 0,5 %) e CD3⁻NKR-P1⁺ (8,8 ± 0,3 %) às custas de uma atividade esplênica citotóxica NK (5,2 ± 0,6 %) significativamente menor que nos controles normais [CD3⁺ (47,8 ± 2,2 %), CD4⁺ (45,6 ± 1,3 %), CD8⁺ (10,7 ± 0,4 %), CD3⁻NKR-P1⁺ (4,9 ± 0,4 %), NKac (8,9 ± 0,7 %), CD3⁺NKR-P1⁺ (1,6 ± 0,2 %) , ACTH (10,2 ± 1,4 pg/ml), corticosterona (2,2 ± 0 ng/ml)]. Esses dados foram correlacionados a um aumento dos níveis plasmáticos de ACTH (92,2 ± 38,5 pg/ml) e corticosterona (152,1 ± 42,5 ng/ml).

A administração de 20 nmoles de SP aumentou a retenção de células CD4⁺ (51,3 ± 1,7 %) e CD8⁺ (15,0 ± 0,8 %) no baço, com um aumento da porcentagem de células CD3⁻NKR-P1⁺ (10,4 ± 0,9 %) e conseqüente diminuição da citotoxicidade NKac (5,4 ± 0,6 %) no pico dos sintomas clínicos, comparados aos controles salina [CD4⁺ (41,2 ± 4 %), CD8⁺ (11,8 ± 1,5 %), CD3⁻NKR-P1⁺ (6,5 ± 1,7 %) , NKac (7,6 ± 0,2 %), ACTH (47,1 ± 6,1 pg/ml), corticosterona (120,3 ± 17,8 ng/ml)]. Isto foi acompanhado por um decréscimo nos

níveis dos hormônios adrenocorticotróficos ($21,3 \pm 2,3$ pg/ml) e corticosterona ($44,1 \pm 16,2$ ng/ml).

As células $CD3^+NKR-PI^+$ [antagonista + salina ($0,5 \pm 0,04$ %) e antagonista + SP ($0,6 \pm 0,1$ %)], um outro tipo celular implicado na auto-imunidade, foram reduzidas pela injeção do antagonista da SP, quando comparadas ao grupo salina ($1,3 \pm 0,1$ %), sugerindo um papel para a SP no fluxo migratório desse tipo celular no baço.

Concluindo, os dados obtidos neste trabalho sugerem que a SP influencia o eixo HHA, podendo também modular o tráfego celular linfocitário e a resposta imune no baço e, portanto, deve ser um elemento importante nos processos de modulação da EAE.

1.INTRODUÇÃO

1.1. CONCEITOS GERAIS

A homeostasia do organismo é garantida por relações harmônicas de funcionamento entre seus vários sistemas, mas interações complexas entre estresse, comportamento e imunidade, onde testemunham numerosas observações clínicas e experimentais, sugerem a intervenção do sistema neuroendócrino na regulação do sistema imune (ADER, FELTEN, COHEN, 1991). Evidências que suportam essa hipótese são a presença de receptores para vários hormônios e neurotransmissores em esplenócitos, linfonodos, timo e medula óssea, os quais são inervados pelo sistema nervoso autônomo (BESEDOVSKY, DEL REY, SORKIN, 1983). Do mesmo modo, o sistema imune, através de suas células, sintetiza e libera produtos que atuam no Sistema Nervoso Central (SNC), demonstrando a existência de comunicações bidirecionais que sustentam o funcionamento harmônico da interação imunoneuroendócrina (BESEDOVSKY *et al.*, 1983).

O hipotálamo é, certamente, pelo seu papel central no comando neural de numerosas funções biológicas, uma das estruturas cerebrais envolvidas na regulação do sistema imune, por representar um centro integrativo para as respostas endócrinas e autonômicas e, por conseguinte, modular a resposta imune, através da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) e do sistema nervoso simpático, face a um estímulo imunogênico (CRUSE *et al.*, 1996; BUCKINGHAM *et al.*, 1997). Constatam-se exemplos práticos em lesões eletrolíticas hipotalâmicas bilaterais e incompletas, onde se verifica depleção celular no baço e timo, após um mês de lesão (ISAKOVIC & JANKOVIC, 1973). Além disso, lesões da área hipotalâmica pré-óptica anterior em ratos deprimem a proliferação de linfócitos T circulantes e esplênicos face a mitógenos específicos (CROSS, BROOKS, ROSZMAN, 1982), e a atividade “Natural Killer” (NK) no baço (CROSS *et al.*, 1984); assim como lesões da região tuberoinfundibular do hipotálamo de camundongos deprimem a atividade NK, sem modificação de linfócitos e macrófagos (FOURNI *et al.*, 1983). Além disso, lesões do hipotálamo ventromediano deprimem a função fagocitária dos macrófagos (LAMBERT & HARRELL, 1981). Em adição, lesões corticais cerebrais esquerdas, mas não direitas, em camundongos, comprometem seletivamente a citotoxicidade das células NK e a resposta das células T à estimulação mitogênica, sem afetar as células B ou macrófagos (BIZIÈRE *et al.*, 1985).

Para esse nível de modulação da resposta imune, vários são os agentes implicados, como citocinas e neuropeptídeos. Entre os neuropeptídeos, a substância P (SP) é a mais estudada, tendo um papel bem definido no sistema nervoso como neurotransmissor e como regulador da resposta imune, principalmente na inflamação crônica (CULMAN, ITOI, UNGER, 1995; CRUSE *et al.*, 1996). Este neuropeptídeo tem mostrado influenciar a liberação de hormônios hipofisários, tanto diretamente, como através da mediação dos fatores liberadores hipotalâmicos. Em particular, está envolvido centralmente, mediando a inibição da liberação de adrenocorticotrofina (ACTH) pela hipófise anterior (CHOWDREY, JESSOP, LIGHTMAN, 1990; JESSOP *et al.*, 1992).

Injeção intracerebroventricular (icv.) de SP em ratos diminui a concentração de ACTH plasmático, provavelmente através da inibição da liberação do hormônio liberador da corticotrofina (CRH) pelo hipotálamo e do aumento dos níveis da arginina vasopressina (AVP), atuando, supostamente, a nível de corpos celulares dos neurônios parvocelulares do núcleo paraventricular do hipotálamo (JESSOP *et al.*, 1992, LARSEN *et al.*, 1993). Isto sugere que a SP regula a resposta hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) ao estresse (JESSOP *et al.*, 1992; LARSEN *et al.*, 1993).

Uma resposta ao estresse ocorreria, centralmente, através da indução da liberação de interleucina-1 (IL-1) e fator α de necrose tumoral (TNF- α) pelas células gliais e leucócitos mononucleares, os quais promoveriam a secreção de outras citocinas (MARTIN *et al.*, 1992; ZHU *et al.*, 1996). Portanto, esses achados indicam que a SP possa funcionar como um neuromodulador, envolvida na modulação das respostas imunoinflamatórias, celular e humoral, apresentando papéis similares em certas inflamações do sistema nervoso central, como doenças desmielinizantes auto-imunes (ZHU *et al.*, 1996). A recente descoberta de astrócitos imunoreativos à SP nas placas de Esclerose Múltipla (EM) aumenta a possibilidade de que esse peptídeo possa ser importante no desenvolvimento de placas e na história natural da doença (KOSTYK, KOWALL, HAUSER, 1989; BARKER & LARNER, 1992).

Os linfócitos T são o suporte celular essencial deste modelo; linhagens de linfócitos T encefalitogênicas específicas para certos epitopos de proteínas da mielina podem induzir uma encefalomielite alérgica experimental (EAE), mesmo se a participação concomitante de auto-anticorpos anti-mielina no processo de desmielinização parecer indispensável (WEKERLE *et al.*, 1986; ZAMVIL & STEINMAN, 1990; RAINE, 1991).

O papel da SP na resposta inflamatória associada a doenças auto-imunes, como a artrite reumatóide, é bem reconhecido (CHOWDREY *et al.*, 1995). Em ratos artríticos, concentrações de ACTH e corticosterona são cronicamente elevadas, apesar do decréscimo de níveis de CRH, provavelmente devido à atividade aumentada de SP em áreas hipotalâmicas (CHOWDREY *et al.*, 1995). Esta aparente controvérsia é explicada por um aumento do nível de AVP, que assume a diretriz estimulatória do eixo HHA (CHOWDREY *et al.*, 1995).

Apesar dos estudos sobre a importância de glicocorticóides endógenos em mediar as características da EAE monofásica em ratos Lewis (BOLTON *et al.*, 1997), trabalhos recentes sugerem o papel regulatório empregado pelas células NK nesse tipo de modelo, (MATSUMOTO *et al.*, 1998) um tipo celular morfológica e funcionalmente distinto de subtipo linfocitário, com a capacidade de eliminar espontaneamente uma ampla variedade de células tumorais e viralmente infectadas, poupando a maioria das células normais (WHITESIDE, VUJANOVIC, HERBERMAN, 1998). Um outro subtipo celular, a célula NKT (CD3⁻NKR-P1⁺ ou NKR-P1⁺ TCR $\alpha\beta$, como são designadas) teria um papel regulatório em processos auto-imunes, como o diabetes tipo I. Este representa um distinto e funcional tipo de células T, que coexpressa receptores da família das células NK e tem um potencial singular para secretar rapidamente grandes quantidades de citocinas, incluindo IL-4 e IFN- γ , assim como IL-5, IL-10, TNF- α , promovendo ajuda precoce para células efetoras poderem regular algumas das respostas imunes Th1 e Th2. Essas últimas pertencem à linhagem linfocítica auxiliar, sendo que o linfócito Th1 atua principalmente em reações de hipersensibilidade do tipo tardia, imunidade celular e viral, produzindo IL-2, TNF- α e IFN- γ ; e as células Th2 estão envolvidas na proliferação e diferenciação de linfócitos B, participando na defesa contra parasitas e em processos alérgicos, produzindo IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 (OLSSON, 1995). O tipo celular representado pelas células

NKT está presente na maioria dos tecidos onde as células T são encontradas e seu desenvolvimento de origem permanece um ponto de controvérsia (HAMMOND *et al.*, 1999). Uma deficiência nas células NKT tem sido implicada em algumas doenças auto-imunes, incluindo a gastrite auto-imune em camundongos timectomizados neonatalmente, doença similar ao lupus, esclerose sistêmica em humanos, e susceptibilidade ao diabetes tipo I em camundongos diabéticos não obesos (NOD), com evidências similares em humanos com diabetes tipo I (HAMMOND *et al.*, 1999).

Com base nessas constatações, decidiu-se investigar o papel da SP na frequência relativa das subpopulações de células T, incluindo-se o estudo de células NKT, assim como a atividade citotóxica “Natural Killer”, correlacionando-se esses parâmetros com níveis hormonais neste modelo experimental de estresse inflamatório crônico.

1.2. ESCLEROSE MÚLTIPLA: HISTÓRIA NATURAL DE UMA SÍNDROME AUTO-IMUNE

1.2.1. Conceitos gerais

A Esclerose Múltipla é uma doença inflamatória que afeta multifocalmente a mielina do sistema nervoso central (SNC), resultado de um ataque imunitário seguido de uma destruição da bainha da mielina, englobando normalmente as fibras nervosas e perda de oligodendrócito (TALBOT, 1995). As manifestações clínicas são muito variáveis; não existe nenhum sintoma ou sinal específico da doença. Sua ocorrência é em adultos jovens, entre 20 e 45 anos, manifestando-se raramente antes dos 15 anos ou após os 50 anos. Sua evolução é imprevisível e polimórfica, conhecendo-se formas evoluindo em surtos (com ou sem remissão), lentamente progressivas, e formas silenciosas. O diagnóstico da doença repousa exclusivamente em critérios clínicos: a disseminação dos sinais clínicos no espaço e no tempo e a exclusão de outras patologias. A etiologia dessa condição é desconhecida, mas admite-se atualmente que se trata de uma doença de etiologia multifatorial, onde pelo menos três fatores parecem ter um papel essencial na sua determinação: um fator ambiental, provavelmente de origem viral; um terreno genético, explicando uma susceptibilidade

particular à patologia; e uma disfunção do sistema imunitário, definindo uma patologia dita auto-imune. A intervenção desses dois primeiros fatores, meio ambiente e genético, é provada por estudos epidemiológicos que têm mostrado uma repartição geográfica específica da doença em certas populações humanas predispostas (ALLEN, 1981; SAYETTA, 1986; MCDONALD, MILLER, BARNES, 1992). A única associação genética bem documentada da doença é com os antígenos de histocompatibilidade da classe II (MHC-II) do tipo HLA-DR2, onde os genes envolvidos estão localizados no cromossomo 6 (TALBOT, 1995). Entretanto, na população finlandesa, de alta prevalência para EM, um novo gene de susceptibilidade à EM foi recentemente localizado no cromossoma 5 em 5p14-12, cuja mesma região, no camundongo, contém um gene de susceptibilidade à EAE (LYON-CAEN & CLANET, 1997).

Existem também vários argumentos evocando uma disfunção auto-imune, onde o principal é a existência de um modelo animal bem estabelecido para doença auto-imune do sistema nervoso central mediado por células T CD4⁺ específicas a determinantes encefalitogênicos da mielina, a encefalomielite alérgica experimental. Este modelo experimental permanece o mais válido para a Esclerose Múltipla, possuindo características clínicas e imunopatológicas similares àquelas da doença, proporcionando, portanto, reflexões sobre como o sistema imune pode provocar uma resposta imunopatológica característica daquela conhecida na EM (RAINE, 1984; WEKERLE, 1985; DAVISON, 1992). A lesão histopatológica elementar é a placa, lesão de desmielinização perivenular bem delimitada, de contornos arredondados, respeitando habitualmente o axônio. Segundo sua classificação, existem as placas agudas com desmielinização ativa, caracterizadas pela presença de células inflamatórias, de linfócitos e macrófagos predominantemente repletos de lipídeos provenientes da degradação da mielina, e as placas crônicas, desprovidas de células inflamatórias e de macrófagos, e que são o local de uma intensa gliose de astrócitos e oligodendrócitos. Em humanos, a coexistência, em um mesmo paciente, de placas ativas e crônicas é, habitualmente, o testemunho de seu desenvolvimento evolutivo no tempo (MCDONALD & BARNES, 1989; RODRIGUEZ & SCHEITHAUER, 1994).

1.2.2. Imunopatologia

A natureza das células mononucleadas presentes nas placas ativas pode ser evidenciada pelas técnicas imunoistoquímicas: trata-se essencialmente de LT, macrófagos e plasmócitos. Os macrófagos se localizam no centro da lesão e seu número decresce em direção à periferia. A proporção de LT CD4⁺ e LT CD8⁺ no seio das lesões varia segundo a idade e o nível de atividade das placas. Os LT CD8⁺ parecem predominar nas regiões perivasculares e os LT CD4⁺ se acumulam na periferia da placa, zona a partir da qual a desmielinização progride. Os LT são também presentes à distância das placas, na substância branca de aparência normal. Os LT CD4⁺ CD45RA são excepcionais no seio das lesões de EM. Esses marcadores são característicos dos LT auxiliares nativos. Astrócitos e células endoteliais exprimem, na sua superfície, moléculas HLA da classe II, e os LT, a molécula CD25 (receptor de IL2). IL1 e o fator α de necrose tumoral (TNF α) são expressos de maneira predominante pelos macrófagos e células microgliais e, mais raramente, pelas células endoteliais e astrócitos. A expressão dessas citocinas parece correlacionada com o índice de atividade da placa. O interferon γ , uma outra citocina pró-inflamatória mais potente, é particularmente expresso nos infiltrados peri-inflamatórios pelas células astrocitárias e microgliais, mas sem correlação evidente com o tipo de lesão. A IL2 foi detectada de maneira difusa nas lesões, mas se encontra concentrada nos infiltrados perivasculares e favorece as respostas T do tipo Th1. As interleucinas IL4, IL10 e o fator de transformação do crescimento (TGF β 1), secretados pelos LT CD4⁺ Th2 e pelas células supressivas, controlam no animal a intensidade de uma resposta imune, notadamente no SNC.

Contrastando com dados experimentais, na EM, a IL4 é expressa em altos níveis, tanto nas lesões agudas quanto nas crônicas ativas. A IL10 é encontrada predominantemente sobre os astrócitos, na periferia das lesões crônicas ativas. O TGF β 1 é produzido em todos os tipos de lesões de EM, em particular pelas células endoteliais vasculares, mas pode ser também encontrado no cérebro de pessoas sem patologia neurológica. Portanto, nenhuma correlação estrita pode ser estabelecida entre o tipo de citocina produzida *in situ* e a evolução das lesões, tornando difícil a análise e interpretação

desses dados, a nível clínico. Entretanto, a presença *in situ* de linfomonoquina não significa, necessariamente, sua implicação patogênica. Elas podem, contudo, participar de alças reguladoras, visando a controlar a reação imunitária em curso.

Moléculas de adesão de célula vascular (VCAM-1), presentes na superfície das células endoteliais e da micróglia, e seu receptor linfocitário de ativação tardia (VLA-4) são fortemente expressas nas lesões crônicas ativas e mais fracamente nas lesões agudas. Uma marcação intensa para ICAM-1 (molécula de adesão celular intercelular-1) pelas células endoteliais e astrócitos é encontrada nas lesões agudas (LYON-CAEN & CLANET, 1997).

Portanto, a seqüência dinâmica de todo esse processo se iniciaria por macrófagos que, ao expressarem moléculas do complexo de histocompatibilidade principal classe II (MHC-II), apresentariam antígenos próprios modificados dos receptores de LT (TCR) às células Th1. Posteriormente, leucócitos migrariam pelo endotélio vascular cerebral, ligando-se às moléculas de adesão e liberariam proteases que lesariam o tecido, facilitando a migração dessas para o parênquima cerebral. Portanto, a destruição da mielina ocorreria pela ação tóxica do TNF e de radicais livres, liberados por LT e macrófagos, além da ativação do complemento, promovida por linfócitos B (ANDERSON & GOODKIN, 1998).

1.2.3. Anomalias da imunidade humoral

Uma hiperproteinoorraquia (0,5g/l) está presente em 1/3 dos pacientes com EM e uma elevação de cadeias leves de IgG (notadamente IgG1 kappa) e IgM, sem anomalia sérica associada, é freqüente. Esta síntese intratecal está presente em mais de 90% dos pacientes portadores de EM e constitui um apoio diagnóstico, embora ela possa aparecer em outras afecções inflamatórias do SNC e, mesmo, em certos pacientes sãos.

Nota-se, também, a presença de complexos imunes, de uma baixa da taxa de C4 e C9, e de produtos de ativação do complemento, notadamente do complexo de ataque da membrana. Estes dados são considerados como testemunho de uma ativação local do sistema imunitário. (LYON-CAEN & CLANET, 1997)

1.2.4. Anomalias da imunidade celular

As fases clinicamente ativas da doença (surtos ou forma progressiva) são freqüentemente associadas a uma baixa da porcentagem dos linfócitos T CD8⁺, levando a uma elevação da razão CD4/CD8. Esta queda parece resultar de uma anomalia quantitativa da expressão da molécula CD8⁺ à superfície dos LT, onde a origem permanece indeterminada. A expressão do receptor para o fragmento Fc das IgG à superfície dos LT está, também, diminuída nos surtos e se eleva durante a fase de regressão dos sintomas.

As taxas elevadas de IL2 e de formas solúveis do receptor de IL2 em fase ativa confirmam esta ativação dos LT do líquido.

Uma elevação significativa no TNF- α ocorre nas formas clinicamente ativas da doença, comparadas às formas estáveis.

A atividade supressiva da síntese de IgG induzida pela reação linfocitária mista autóloga é, também, diminuída em caso de EM progressiva e esta diminuição é correlacionada com a baixa dos LT CD4⁺ CD45RA. De maneira paralela a esta baixa da atividade dos LT supressores, sinais de ativação dos LT são detectados nos pacientes apresentando uma doença evolutiva: aumento das taxas séricas de IL2 (LYON-CAEN & CLANET, 1997).

1.2.5. Imunidade antiviral e EM

Dentre os fatores ambientais podendo intervir na fisiopatologia da EM, os vírus são, dos agentes infecciosos, os mais provavelmente implicados na sua patogênese.

Uma quinzena de vírus foram associados à EM, sem que um único candidato mais convincente tenha-se imposto. Os coronavírus são, dentre os últimos da lista, fornecedores de um dos modelos mais interessantes de uma doença viral semelhante às várias características da EM. A hipótese viral da doença permanece razoável, mas é pouco provável que um único vírus seja o causador. Vários vírus poderiam desencadear a doença por um mecanismo comum de indução de reações auto-imunitárias em pessoas geneticamente susceptíveis.

Fatores comportamentais poderiam ter um papel na eclosão dos fenômenos auto-ímmunes, como a degradação tissular que poderia promover a entrada de auto-antígenos normalmente inacessíveis ao sistema imunitário. Os agentes infecciosos podem favorecer, no sítio de infecção, a produção de interferon γ e a expressão de moléculas HLA de classe II e ativar também linfócitos auto-reativos. Enfim, os microorganismos podem intervir, através de um mimetismo molecular, na origem de uma resposta auto-ímmune, em razão da existência de uma comunidade antigênica entre um antígeno exógeno e um auto-antígeno (LYON-CAEN & CLANET, 1997).

1.2.6. Mecanismos imunológicos da desmielinização

Vários mecanismos efetores participam no processo de desmielinização. Os mais importantes são a ativação dos linfócitos T $CD4^+$ Th1 e a estimulação macrófágica que ela favorece. No seio das lesões, os macrófagos fagocitam a bainha de mielina. Esta interação parece ser favorecida pelos receptores de superfície dos macrófagos para o fragmento Fc das IgG e para o complemento. A via do complemento é ativada no LCR dos pacientes e, qualquer que seja o mecanismo dessa ativação, uma destruição com a vesiculação da mielina pode resultar. Os macrófagos e as células microgliais podem também produzir monóxido de nitrogênio (NO), radicais oxigenados, proteases e fosfolipases, onde o efeito mielotóxico é estabelecido *in vitro*. O NO e a forma indutível da NO sintetase são fortemente expressos nas lesões da EM, enquanto que são raramente detectados nos cérebros de controles.

Numerosas citocinas são detectadas nas placas ativas. Dentre elas, notadamente o TNF- α pode induzir, *in vitro*, uma destruição miélnica e uma morte apoptótica dos oligodendrócitos. Se bem que os oligodendrócitos sejam habitualmente desprovidos de moléculas HLA de classe I, uma ação direta dos LT citotóxicos é possível. Assim, surge a hipótese segundo a qual os LT $\gamma\delta$, presentes no seio das lesões e não dependentes das moléculas HLA para exercer seu efeito citotóxico, poderiam participar da destruição miélnica. (LYON-CAEN & CLANET, 1997)

1.3. ENCEFALITE ALÉRGICA EXPERIMENTAL

1.3.1. Histórico

A história da EAE iniciou-se em 1885, quando Louis Pasteur colocou em evidência uma vacina contra a raiva. Este tratamento anti-rábico consistia em injetar, na pessoa mordida, medula de coelho raivosa dissecada e triturada com água salgada e glicerinada. Injetava-se todos os dias, ou a cada dois dias, uma emulsão de medula rábica cada vez menos dissecada, até chegar, pelo 20º dia, à medula fresca de 24h, a mais virulenta. Esta vacina permitiu a cura de numerosos pacientes. Entretanto, foi averiguado que um número significativo de pacientes vacinados desenvolvia uma reação imunológica forte, que provocava uma paralisia, às vezes fatal (Encefalomielite pós vacinal). Após longas discussões sobre o papel do vírus atenuado, foi T.M. Rivers, em 1933, que demonstrou, pela primeira vez, que a injeção repetida de extrato do sistema nervoso central provocava uma encefalomielite no macaco (EAE) (RIVERS, SPRUNT, BERRY, 1933). Após o desenvolvimento do adjuvante de Freund (uma preparação de óleo de parafina, agente emulsificante, e de *Mycobacterium tuberculosis* inativado, que estimulava o sistema imunitário de maneira não específica), a EAE pôde ser induzida facilmente e de maneira reprodutível em várias espécies (FREUND, 1956). Foi somente nos anos 60, próximo de um século da descoberta da vacina contra a raiva, que a equipe de M.W. KIES isolou a proteína responsável por esta afecção: a proteína básica da mielina (PBM) (KIES, MURPHY, ALVORD, 1960). Durante longo tempo, a PBM foi considerada como o único antígeno encefalitogênico do sistema nervoso central. Depois, demonstrou-se o papel de outros antígenos e de outros componentes da mielina.

1.3.2. Fisiopatologia da EAE

A resposta imunitária, apesar de diversa e complexa, faz intervir os mesmos mecanismos elementares em todo o organismo. Entretanto, a presença da barreira hematoencefálica (BHE), a ausência de um sistema linfático convencional e as taxas inabitualmente discretas de antígenos do complexo de histocompatibilidade principal (MHC), conferem um estado particular ao sistema nervoso central e à fisiopatologia da EAE.

Ao estado normal a BHE:

- constitui um obstáculo normal à difusão de anticorpos e à passagem da grande parte das células através do sistema nervoso central, o que habitualmente o protege das agressões de origem infecciosa, dos seus produtos e das reações imunitárias que elas suscitam.
- seqüestra os antígenos e as reações imunitárias intracerebrais, o que limita sua amplificação e eficácia.

O papel da BHE na imunidade cerebral não se limita a um papel de obstáculo passivo. Ela tem um papel imunologicamente ativo, controlando o tráfico das células entre o sangue e o SNC. Foi demonstrado recentemente que, em estado normal, somente os linfócitos T ativados, independentemente da sua especificidade e do seu fenótipo, foram capazes de atravessar a BHE e de penetrar no SNC, a fim de efetuar a retaguarda imunológica (WEKERLE *et al.*, 1986; HICKEY, HSU, KIMURA, 1991). No curso de uma inflamação, a passagem das células entre o sangue e o sistema nervoso central é muito menos seletiva e as células endoteliais têm um papel de primeiro plano neste fenômeno, por vezes como autoras, outras como alvos (MCCARRON *et al.*, 1993).

A fisiopatologia da EAE pode ser resumida em 4 etapas:

1) Sensibilização e expansão clonal dos linfócitos T na periferia

No sítio do inóculo, os macrófagos, que expressam moléculas MHC-II, fagocitam o auto-antígeno e apresentam fragmentos destes, peptídeos antigênicos modificados aos receptores de linfócitos T (TCR) nas células Th1. Moléculas co-estimulatórias como a B7 e CD28 têm particular importância na apresentação do antígeno. Posteriormente, os linfócitos T, sensibilizados e ativados, se multiplicam e ganham os gânglios linfáticos após a circulação sangüínea. O adjuvante de Freund, utilizado nesses modelos, permite estimular o sistema imunitário de maneira não específica, provocar uma inflamação local e atrair um afluxo de macrófagos. Portanto, criam-se condições imunológicas ideais para a apresentação do auto-antígeno e de sua liberação progressiva e prolongada (FREUND, 1956).

2) Migração dos linfócitos T através da BHE

A passagem através da BHE dos linfócitos T se faz pela via transendotelial, preferencialmente ao nível das regiões vizinhas das junções de células endoteliais, onde a expressão das moléculas de adesão é elevada (RAINE *et al.*, 1990; LASSMANN *et al.*, 1991; LOSSINSKY *et al.*, 1991). O recrutamento seqüencial dos linfócitos T e de todos os outros leucócitos comporta várias etapas sucessivas: o acúmulo dessas células na microcirculação, sua aderência ao endotélio vascular e sua migração através da parede vascular pelos sítios de ação específicos.

O acúmulo dos linfócitos T tem lugar principalmente sobre as células endoteliais de vênulas pós-capilares, onde a lentidão do fluxo sangüíneo e a fraqueza das forças de fricção, às quais são submetidas as células, favorecem a migração celular. Ela é igualmente facilitada pelo efeito quimiotático de certas citocinas, como a IL-8. As citocinas IL-1, IL-2, TNF α modulam a produção de mediadores, exercendo um efeito vasodilatador (MANTOVANI & DEJANA, 1989). Um efeito rápido de IL-1, TNF α e IFN- γ sobre o citoesqueleto endotelial capilar conduz a um aumento prolongado da permeabilidade da BHE (MCCARRON *et al.*, 1993). As células endoteliais ativadas pelas citocinas tornam-se volumosas e cúbicas, comparadas ao endotélio delgado e achatado, geralmente observado na microcirculação. O aumento da sua superfície e diâmetro da parede vascular lentifica o fluxo sangüíneo e o transforma em fluxo tubular. Essas modificações morfológicas se acompanham de modificações funcionais com a expressão de moléculas de superfície de adesão implicadas na relação com outras células imunocompetentes: linfócitos B, linfócitos T não específicos, monócitos, leucócitos polimorfonucleares, etc. (CROSS *et al.*, 1990; KARIN *et al.*, 1993; KOHLRAUSCH *et al.*, 1992; LANNES-VIEIRA *et al.*, 1994). Inicialmente, essa adesão é fraca e ocorre com a interação do LFA-1, presente na membrana dos linfócitos, com as moléculas de adesão celular ICAM-1/ICAM-2, presentes nas células endoteliais. Posteriormente, em uma ligação mais forte, ocorre uma interação do VLA-4 com a VCAM-1 (HARTUNG *et al.*, 1995).

A aderência de células imunocompetentes e das células endoteliais ativadas coloca em jogo 3 famílias de moléculas: as proteínas, de aderência aparentadas às imunoglobulinas, que possuem, na parte extracelular de sua estrutura, características análogas àquelas constituintes das cadeias leves e pesadas das imunoglobulinas; as seletinas, que têm uma forte analogia estrutural com os receptores transmembranários reagrupados sob o termo de C-lectinas; e as integrinas, que são heterodímeros resultantes de uma associação de cadeias α e β . Cada uma dessas proteínas tem um papel preciso no curso do processo de aderência. As seletinas promovem a lentidão do deslocamento das células imunocompetentes no fluxo sanguíneo, a fim de aumentar a frequência e a duração dos seus contatos com o endotélio. A P-seletina, onde a indução muito rápida é provocada por agentes não específicos como a histamina, a trombina e as prostaglandinas, interage preferencialmente com os leucócitos polimorfonucleares e os monócitos. A E-seletina, onde a indução é muito tardia e dependente de mediadores da inflamação (citocinas), assegura mais especificamente o recrutamento dos linfócitos, quando do desencadeamento da reação inflamatória. A estabilização da aderência faz intervir notadamente as proteínas ICAM-1, molécula de adesão celular intercelular-1 e VCAM-1, molécula de adesão celular vascular-1, onde os ligantes leucocitários pertencem à família das integrinas.

A migração transendotelial das células imunocompetentes e sua penetração no tecido cerebral é assegurada principalmente pelas modificações da avidéz das integrinas. Quando as integrinas são reagrupadas em pontos de contato focais e são imóveis, elas são responsáveis pela aderência estável (DELISSER, NEWMAN, ALBEDA, 1994).

3) Resposta inflamatória no SNC

O desencadeamento da inflamação necessita do reconhecimento do antígeno pelos linfócitos T encefalitogênicos no contexto das moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) da classe II em presença das células apresentadoras de antígenos (APCs). Em estado normal, poucos macrófagos perivasculares, notadamente leptomeníngios, e algumas células microgliais, exprimem as moléculas de classe I e II. As células endoteliais exprimem somente muito poucas moléculas do CMH da classe I, sem exprimir moléculas da classe II (CRAGGS & WEBSTER, 1985).

Ao contrário, uma vez estimuladas pelo interferon γ , próximo de um quarto das células endoteliais, todos os macrófagos perivasculares e as células microgliais exprimem as moléculas de classe II e as apresentam aos linfócitos T. (MCCARRON *et al.*, 1985; VASS & LASSMANN, 1990). Foi demonstrado que, mesmo os astrócitos, sob o efeito do interferon γ , do TNF α ou de uma infecção viral prolongada, poderiam exprimir as moléculas de classe II (CRAGGS *et al.*, 1985; SUZUMURA *et al.*, 1987). Nem os oligodendrócitos, nem a bainha de mielina são capazes de apresentar o antígeno aos linfócitos T encefalitogênicos, pois eles não exprimem as moléculas de classe II. A transposição da BHE parece ser uma etapa indispensável para a ativação dos linfócitos T encefalitogênicos e o desencadeamento da inflamação no sistema nervoso central, pois a injeção intratecal destes não provoca EAE (WEKERLE *et al.*, 1986). Pode-se questionar se a EAE induzida pelos linfócitos T encefalitogênicos é verdadeiramente uma doença da mielina ou da BHE (CROSS *et al.*, 1990; KOHLRAUSCH *et al.*, 1992; KARIN *et al.*, 1993; LANNES-VIEIRA *et al.*, 1994).

Uma vez o antígeno reconhecido, os linfócitos T se transformam em imunoblastos e liberam linfocinas. Dentre as citocinas liberadas no evento, está a IL-12 pelas APCs, que coincide com o aparecimento das primeiras células inflamatórias, antes do início dos sinais clínicos. Com isto, ocorre a diferenciação das células Th1, que expressam IFN- γ e TNF α . Estas promoverão a desmielinização, através da ativação de macrófagos ou por lesão direta sobre os oligodendrócitos. Estes imunoblastos aumentam a permeabilidade da BHE e provocam um edema vasogênico e um afluxo de linfócitos não específicos, macrófagos, leucócitos polimorfonucleares neutrófilos, anticorpos e complemento. Os sinais clínicos aparecem neste estado. No modelo de EAE aguda, a reação inflamatória regride em seguida e lentamente, sem deixar seqüela clínica ou histológica. Para tal, estão envolvidas as ILs-4,10,13, produzidas pelos linfócitos Th2, desativando os macrófagos e aumentando a expressão do TGF- β , produzido pelos linfócitos Th2 e Th3. (LASSMANN *et al.*, 1991; MARTIN, MCFARLAND, MCFARLIN, 1993; OLSSON, 1995).

4) Destruição da mielina

No modelo de EAE crônica, a reação inflamatória ataca a bainha de mielina e provoca uma desmielinização. Seja ela qual for, imuno específica ou não, os mecanismos efetores da desmielinização são em número de dois: citotoxicidade por mediação celular (citotoxicidade mediada por células T) e citotoxicidade por mediação celular dependente de anticorpos.

Existem vários argumentos *in vitro* que demonstram uma ação desmielinizante direta de linfócitos T encefalitogênicos. Eles têm a propriedade de produzir linfocinas e induzir um efeito citotóxico sobre as células apresentadoras de antígenos, tais como os astrócitos ou células endoteliais (FONTANA, FIERZ, WEKERLE, 1984; MCCARRON *et al.*, 1991), e sua adição a uma cultura de células do sistema nervoso central singênico provoca uma desmielinização em algumas horas (LYMAN *et al.*, 1988; YAROM *et al.*, 1983). Por outro lado, estudos em microscopia eletrônica, realizados em animais acometidos de EAE, demonstram uma relação íntima entre os linfócitos T encefalitogênicos e a bainha de mielina (HIRANO, KAWANAMI, LLENA, 1994). Apesar de todas essas observações, dois argumentos colocam em dúvida o papel da citotoxicidade direta dos linfócitos T na patogênese da desmielinização: ausência de desmielinização devido a uma injeção intratecal de linfócitos T encefalitogênicos e a incapacidade de oligodendrócitos para apresentar o antígeno (WEKERLE *et al.*, 1986).

Os astrócitos (FONTANA, FIERZ, WEKERLE, 1984) e sobretudo as células microgliais (GIULIAN, 1987) são bons candidatos como células efetoras de desmielinização. Uma vez ativadas por linfócitos T encefalitogênicos, elas têm a capacidade de exprimir as moléculas do CHM da classe II e de participar da imunoregulação local. Foi reportado que os astrócitos exprimem certas moléculas de adesão, como ICAM-1 e LFA-3, secretando TNF- α e podendo fagocitar a mielina em certos casos (LEE *et al.*, 1990). As células microgliais exprimem os receptores do fragmento Fc das imunoglobulinas e os receptores do complemento, todos os dois implicados na opsonização da mielina. Eles têm uma capacidade de fagocitose importante graças à produção de proteases, agindo essencialmente sobre a PBM, radicais livres, desencadeando uma peroxidação em cadeias de ácidos graxos polinsaturados de lipídeos de

membrana e de TNF- α , levando a uma degeneração dos oligodendrócitos e uma lise da mielina.

Foi demonstrado que uma injeção intratecal ou intraneural de linfócitos T sensibilizados ao PPD, onde uma proteína ausente no SNC, nas condições fisiológicas, podia provocar uma desmielinização dita de “vizinhança” (“bystander”), parecida a uma desmielinização imuno específica (LYMAN *et al.*, 1988). De fato, os oligodendrócitos e a mielina são particularmente vulneráveis aos mecanismos efetores da desmielinização, mesmo se eles são não específicos: todos os dois têm a capacidade de fixar e ativar o complemento; eles são extremamente sensíveis à ação tóxica do TNF- α ; a reação oxidativa desencadeada pelos radicais livres ativa notadamente os oligodendrócitos que contêm concentrações elevadas de Fe⁺⁺; as proteases são ativadas pelo Ca⁺⁺ presentes na mielina (OPDENAKKER & VAN DAMME, 1994).

Ao inverso da desmielinização de “vizinhança”, com o mecanismo da citotoxicidade pela mediação celular dependente de anticorpos, a presença de anticorpos anti-mielina específicos focaliza a destruição tissular da bainha de mielina: inicialmente, com uma ruptura local da BHE, indispensável à sua penetração no sistema nervoso central, e posteriormente, devendo agir com os epitopos de superfície da bainha de mielina, e ativando os mecanismos efetores, seja ativando o sistema do complemento (LININGTON *et al.*, 1989; PIDDLESDEN *et al.*, 1993), ou se fixando sobre o antígeno miélinico correspondente (fenômeno de opsonização) e permitindo a fagocitose pelas células microgliais, comportando os receptores do fragmento Fc das Igs. O melhor exemplo da citotoxicidade pela mediação celular dependente de anticorpos é a imunização combinada pelos Acs anti-MOG e os linfócitos T sensibilizados à PBM (LASSMANN *et al.*, 1988; LININGTON *et al.*, 1988).

1.3.3. Aspectos clínicos e patológicos da EAE

Nenhum modelo de EAE pode, por si só, reproduzir todos os diferentes aspectos da doença humana. Existe uma grande variabilidade de sinais clínicos e histopatológicos, segundo o protocolo de imunização, a natureza do antígeno, sua procedência, espécie e cepa utilizada (RAINE, 1984; TABIRA, 1988). Pode-se, entretanto, separar os traços comuns e classificar todos os diferentes modelos de EAE nos dois grupos principais, a fim de estudar certos mecanismos patogênicos da doença.

A EAE aguda, monofásica, é caracterizada pelas lesões inflamatórias e sinais clínicos reversíveis. Ela reproduz clinicamente em ratos uma recaída da Esclerose Múltipla. Ela pode ser induzida, facilmente, nos animais susceptíveis, por uma injeção intradérmica de um auto-antígeno encefalitogênico emulsificado no adjuvante de Freund (imunização ativa) ou por uma injeção intravenosa ou intraperitoneal de linfócitos T sensibilizados por esses autoantígenos (transferência passiva). Observa-se uma instalação ascendente típica de sinais clínicos: hipotonia distal com a cauda evoluindo rapidamente para uma paraplegia completa com hipoestesia das patas dianteiras e incontinência. Após um platô de 2 a 3 dias, os sinais clínicos desaparecem espontânea e progressivamente. O quadro clínico completo evolui em 15 dias. Com o método de transferência passiva, os sinais clínicos se desenvolvem em alguns dias (em função do número de linfócitos injetados) e o quadro clínico evolui em uma semana. As lesões peculiares da EAE aguda são caracterizadas por infiltrados de células inflamatórias mononucleadas (linfócitos e macrófagos), com predominância perivascular, disseminadas na substância branca do sistema nervoso central, notadamente na medula espinhal e tronco cerebral. A desmielinização é discreta ou ausente (PENDER, 1988; PENDER, NGUYEN, WILLENBORG, 1989).

A EAE crônica é caracterizada por lesões inflamatórias resultando em uma desmielinização, histopatologicamente idênticas àquelas observadas na Esclerose Múltipla. Trata-se de largas placas sub-piais alongadas ao longo da medula espinhal ou de pequenas placas profundas perivasculares na medula espinhal ou tronco cerebral. No início do processo de desmielinização, as placas são constituídas de células inflamatórias e notadamente de macrófagos, fagocitando os debris da mielina. Depois elas evoluem para uma gliose astrocitária sem sinais de inflamação. Os axônios permanecem

morfologicamente intactos. A EAE crônica pode ser induzida por um homogeneizado do SNC (PENDER, 1988), por injeções repetidas de linfócitos T encefalitogênicos (VANDENBARK *et al.*, 1986) ou por uma imunização combinada utilizando linfócitos T encefalitogênicos e anticorpos implicados na desmielinização (LASSMANN *et al.*, 1988). Segundo a espécie animal utilizada, as doses de linfócitos T e /ou os tipos de anticorpos injetados, os sinais clínicos podem variar de forma hiperaguda, crônica progressiva ou forma crônica com recaídas espontâneas.

A desmielinização é freqüentemente incriminada na gênese dos sinais clínicos da Esclerose Múltipla, pois a presença da mielina, de um lado, acelera o influxo nervoso, transformando a condução contínua em saltatória e, por outro lado, reduz consideravelmente a energia utilizada para a despolarização da membrana neuronal. No curso da EAE, não há correlação evidente entre os sinais clínicos e a desmielinização. A existência, a repartição e a evolução da desmielinização não explicam nem a instalação rápida e ascendente dos sinais clínicos, nem a recuperação progressiva (modelos agudos), nem os défices permanentes (modelos crônicos). Por outro lado, vários estudos *in vitro* falam a favor de lesões da BHE e do edema vasogênico como origem das alterações funcionais dos axônios e, portanto, dos sinais clínicos (SIMMONS *et al.*, 1982; JUHLER *et al.*, 1984; RUMJANEK, LEYTON, MORLEY, 1984; JUHLER *et al.*, 1985; GOLDMUNTZ, BROSNAN, NORTON, 1986).

Portanto, em função do universo etiopatogênico multifatorial que rege a Esclerose Múltipla, principalmente no que tange aos seus aspectos imunopatológicos e, de posse de conceitos já bem estabelecidos na literatura sobre o papel inibidor da SP na atividade do eixo HHA durante o estresse inflamatório crônico, decidiu-se utilizar o modelo experimental de doença desmielinizante inflamatória, a EAE, para estudar a importância da SP e o papel do eixo HHA nos seus mecanismos fisiopatológicos.

2.OBJETIVOS

1) Averiguar o papel do eixo HHA e da imunidade celular mediada por células NK, assim como as alterações nas sub-populações celulares T no modelo de estresse inflamatório crônico conhecido como EAE.

2) Verificar o papel do neuropeptídeo SP nesse modelo de estresse inflamatório crônico e sua influência na atividade hormonal do eixo HHA e na imunidade mediada por células.

3.MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Ratos machos Lewis, com seis a oito semanas de idade, pesando 140-200g, provenientes da colônia do laboratório Harlan France, Paris, França e criados em condições isentas de organismos patogênicos específicos (I.O.P.S.) foram usados ao longo de todo o procedimento experimental. Quarenta e seis machos foram utilizados nesse estudo, tendo sido mantidos individualmente em caixas convencionais por uma semana em um ciclo de luz de 12h /12h, com livre acesso a comida e água.

Os ratos foram tratados de acordo com as regras e regulamentações européias de 24-11-86 (86-609-EEC) e leis francesas (decreto nº 87-848, 19 Oct., 1987).

3.2. CANULAÇÃO INTRACEREBROVENTRICULAR

Uma cânula guia de aço inoxidável 23G foi estereotaxicamente implantada sob anestesia com Ketamina (100 mg/kg, i.p.) 2 mm acima do ventrículo lateral, usando as seguintes coordenadas: anterior, 1,8 mm; lateral, 1,0 mm; profundidade, 5,8 mm; posição plana do crânio (incisivo a -3mm), com bregma como referência. Os animais foram separados e alojados individualmente uma semana antes do início dos experimentos, durante os quais foram manipulados diariamente para habituação.

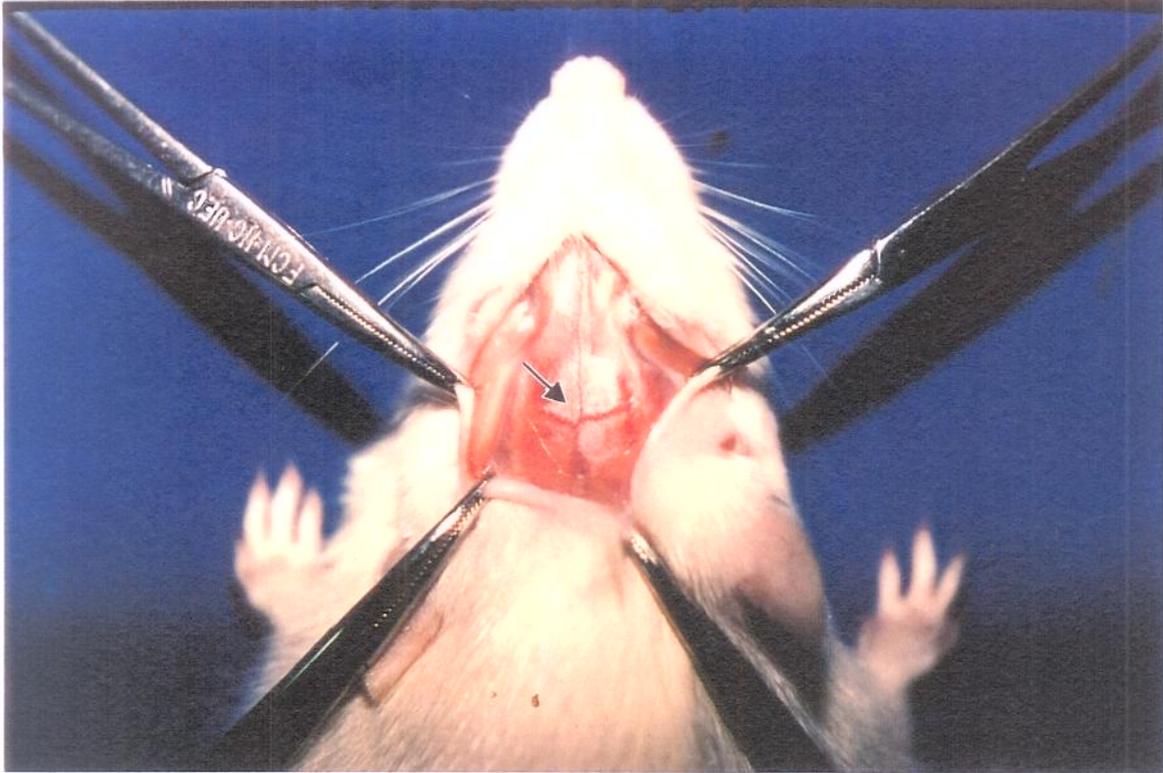


Figura 1A: Procedimento cirúrgico para implantação de cânula intracerebroventricular, notando-se, em detalhe, o local de implantação, segundo medidas estereotáxicas precisas, tendo como referência o bregma (seta).

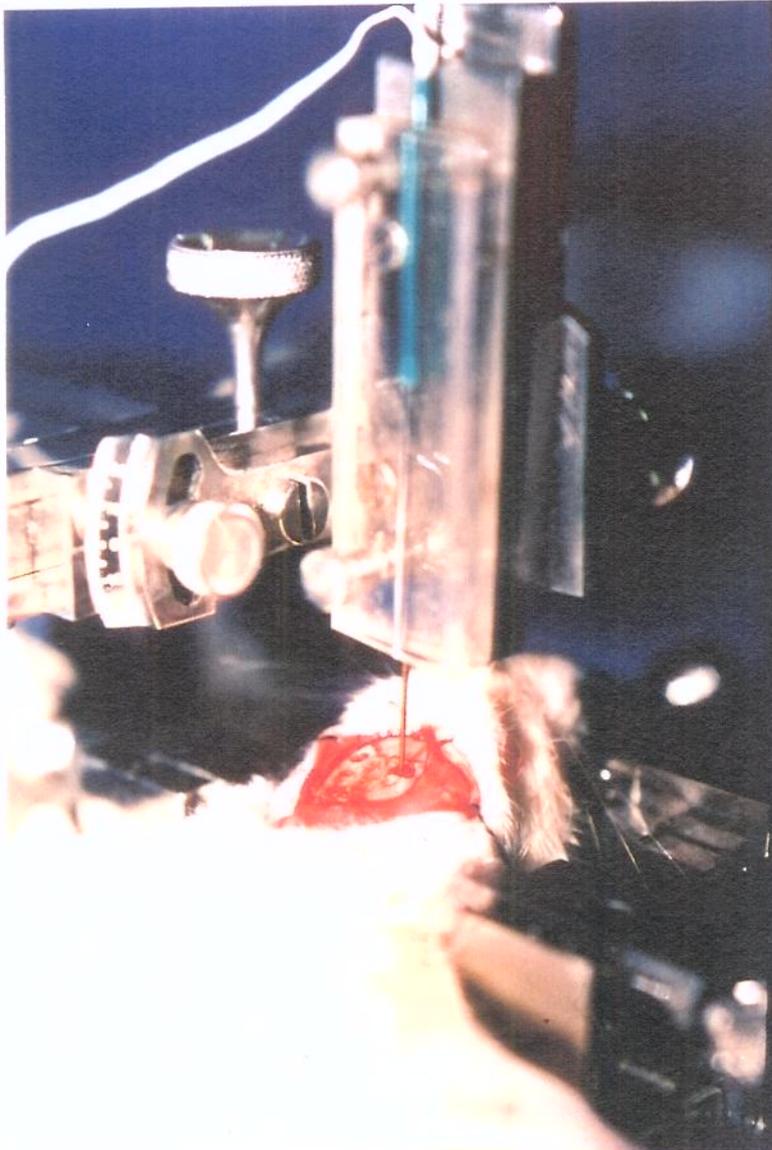


Figura 1B: Aparelho estereotáxico e colocação da cânula intracerebroventricular para tratamento.

3.3. PREPARAÇÃO DA PROTEÍNA BÁSICA DE MIELINA

A Proteína Básica de Mielina (PBM) de cobaia foi isolada e purificada segundo o método de DEIBLER *et al.* (1972). Os lipídeos do cérebro e da medula espinhal de cobaia, congelados e triturados, foram extraídos por homogeneização preparada em 19 volumes de clorofórmio-metanol (2/1-v/v). Após centrifugação (500×g-15 min.), o precipitado foi lavado em acetona, centrifugado novamente e recolocado em suspensão em 2,5 volumes de água. A PBM foi extraída em pH ácido, colocando-se progressivamente HCl 1N até a obtenção de um pH de 3,0. Após centrifugação (1800×g-1h), o sobrenadante foi dialisado com água e liofilizado. O extrato ácido, dissolvido em uréia 4M-HCl 30mM, foi fracionado por cromatografia de filtração sobre gel de poliacrilamida (Biogel P30, Biorad) equilibrado com HCl 20mM a 4°C. A PBM foi eluída na 4ª e última fração, depois liofilizada após a eliminação de uréia por diálise contra HCl 0,5 mM.

A pureza da PBM foi controlada por eletroforese sobre gel de poliacrilamida-SDS (duodecil sulfato de sódio, sigma), segundo o método de Laemmli (1970), que dá uma banda única a 18,5 kDa, utilizando histonas totais de timo de vitelo como marcador de pesos moleculares.

3.4. INDUÇÃO DA EAE

Trinta e dois ratos receberam subcutaneamente nas patas traseiras uma mistura de PBM com adjuvante completo de Freund (ACF) (1956), contendo 0,1 mg de PBM e 0,1ml de ACF (Sigma) com 0,5 mg de *Mycobacterium tuberculosis*, cepa H37RA (Difco), por animal, para induzir a doença. Nove ratos foram usados como controles, e, portanto, injetados apenas com o adjuvante de Freund e os demais remanescentes, como controles negativos, sem o imunógeno ou o adjuvante de Freund.



Figura 2: Injeção de salina, SP ou antagonista da SP, realizada com microbomba de infusão, através da cânula guia.

3.6. SINAIS CLÍNICOS NA EAE

Os ratos portadores de EAE foram pontuados por sinais clínicos, usando-se a seguinte escala: 0, sem fraqueza; 0,5, fraqueza da parte distal da cauda; 1, paralisia de toda a cauda; 2, paraparesia suave de um ou ambos os membros traseiros; 3, paraparesia moderada ou severa ataxia; 4, severa paraparesia; 5, paraplegia flácida total com incontinência; 5,5, quadriparesia ou quadriplegia; 6, estado moribundo (MCFARLIN *et al.*, 1974).

3.7. AVALIAÇÃO POR CITOMETRIA DE FLUXO DE DUAS CORES DAS SUBPOPULAÇÕES DE CÉLULAS T E NK

Células de baço foram dissociadas, dentro de uma solução simples de meio frio de RPMI-1640, enriquecido com 10% (vol/vol) de soro bovino fetal inativado pelo calor, 0,1% de Gentamicina, 1% de L-Glutamina, aminoácidos não essenciais e sódio piruvato. Os leucócitos foram separados pela técnica padrão de phycol-hypaque. Após a separação, as células foram lavadas três vezes por centrifugação a 900 G e a 4°C e ressuspensas em 1 ml de RPMI-1640 frio. As concentrações celulares e os campos celulares foram determinados usando-se um contador automático de células sanguíneas. As células ($1,0 \times 10^6$ células) foram incubadas por 30 min. a 4°C com marcadores de superfície celular de camundongo anti-rato CD3, marcado a FITC (mouse IGM clone IF4), CD4, marcado a FITC (mouse IGG1 clone W3/25), CD8, marcado a PE (mouse IGG1 clone OX8) e NKR-P1, marcado a PE (mouse IGG1 clone 10/78) (100 µl a 1:100 em RPMI-1640, IgG de camundongo anti-rato, "Caltag laboratories - France" e "Serotec laboratories"- Inglaterra, para o NKR-P1). Essas células foram lavadas 1 vez e ressuspensas em 1,0 ml de RPMI-1640 para análise em citometria de fluxo ("Coulter EPICS").

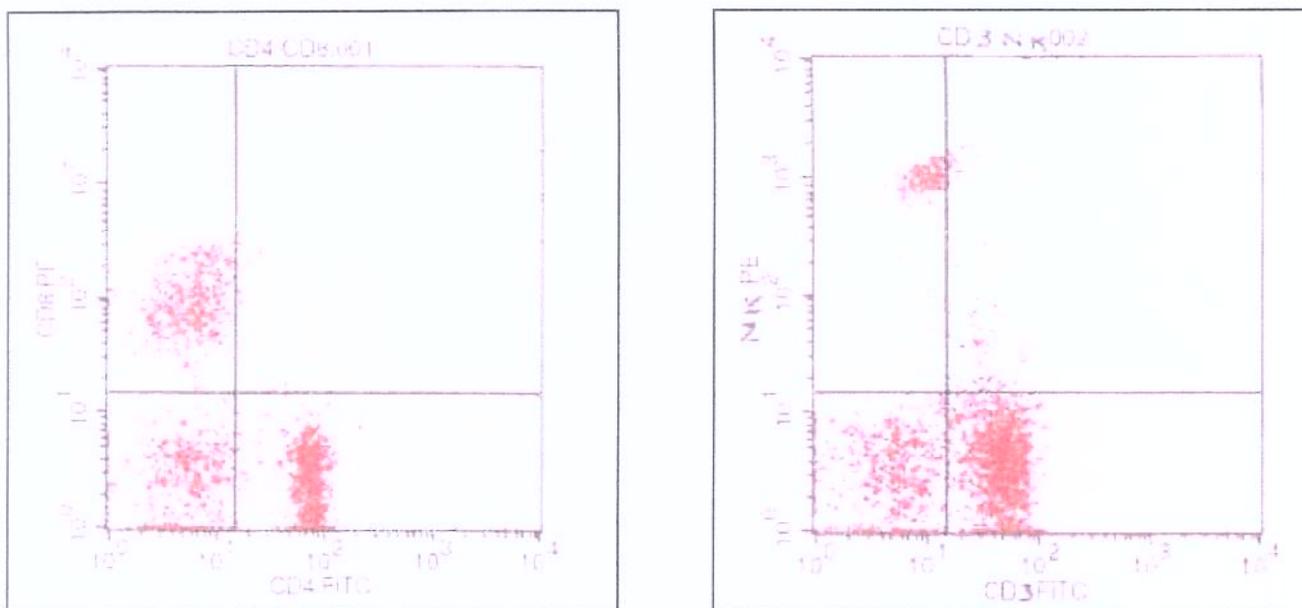


Figura 3: Marcação, por imunofluorescência, dos esplenócitos de ratos.

- A) Imagem do painel, obtido por citometria de fluxo de duas cores, representa as células CD4⁺ (quadrante inferior direito), e CD8⁺ (quadrante superior esquerdo). A quantificação é feita por densitometria.
- B) Imagem do painel de citometria de fluxo de duas cores, representa as células CD3⁺ (quadrante inferior direito), NK (quadrante superior esquerdo) e NKT (quadrante superior direito). A quantificação é feita por densitometria.

3.8. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE NK

Uma parte dessa mesma solução de células foi utilizada para o ensaio de citotoxicidade NK. A atividade NK foi mensurada em um ensaio padronizado de 4h de liberação de cromo radioativo Cr^{51} , usando células de linfoma murino YAC-1 radiomarcadas como alvos. Células de baço foram lavadas três vezes por centrifugação em RPMI-1640 enriquecido com 10% (vol/vol) de soro bovino fetal inativado pelo calor, 0,1% de Gentamicina, 1% de L-Glutamina, aminoácidos não essenciais e sódio piruvato e ajustadas a uma concentração final de 10^7 células por ml. Células de YAC-1 foram marcadas pela incubação com 100 μCi de $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ por 45 min a 37°C em uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2 . Após três lavagens com o mesmo meio de cultura, sua concentração foi ajustada a 4×10^5 células por ml. Misturas de 10^4 células alvo YAC-1 marcadas (25 μl) e 100 μl de suspensão de células de baço foram co-cultivadas em micro placas com 96 poços em fundo arredondado (U) a razões de 100:1, 50:1 e 25:1 de células efectoras/alvos (E/A). Após uma incubação de 4h a 37°C em uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2 , 100 μl de meio frio foram adicionados a cada poço em ordem de parada da reação de citotoxicidade NK. As placas foram centrifugadas a 900 x g por um min. E 120 μl do sobrenadante foi recuperado de cada poço. A radioatividade foi mensurada em cpm, usando-se um contador gama. A porcentagem de lise específica foi calculada usando-se a seguinte fórmula: $[(\text{liberação experimental} - \text{liberação espontânea}) / (\text{liberação máxima} - \text{liberação espontânea})] \times 100$. Aliquotas de 120 μl de sobrenadante dos poços, nos quais somente células YAC-1 foram incubadas, serviram para determinar a liberação espontânea. A liberação máxima foi obtida de 120 μl dos poços nos quais as células YAC-1 foram lisadas. A diferença entre a liberação máxima e a espontânea não foi superior a 10% entre os ensaios.

3.9. ANÁLISES HORMONAIAS

As concentrações da corticosterona, ACTH e AVP foram determinadas por radioimunoensaio (RIA). Este ensaio baseia-se na reação de competição entre o hormônio presente no soro (concentração desconhecida) e o hormônio marcado com isótopo radioativo, pelo sítio de ligação a um anticorpo.

3.9.1. Ensaio de corticosterona sérica

No dia do sacrifício, os ratos foram guilhotinados, o sangue do tronco coletado dentro de tubos plásticos com EDTA, e o plasma, separado e estocado a - 20°C. A corticosterona foi determinada por “Kit de radioimunoensaio como descrito no Boletim Técnico ICN, 1985 (ICN Biomedicals, Inc., Costa Mesa, CA92626)”. A sensibilidade da curva desse ensaio foi 2,2µg/ml, para 91% de ligação, com coeficiente de variação intra-ensaio de <5%.

3.9.2. Ensaio de Hormônio Adrenocorticotrófico sérico (ACTH)

O nível de ACTH sérico foi determinado como descrito no Kit Nichols Institute Diagnostics (San Juan Capistrano, CA 92675), por radioimunoensaio. A sensibilidade da curva desse ensaio foi 6,6pg/ml, para 91% de ligação, com coeficiente de variação intra-ensaio de <5%.

3.9.3. Ensaio de Arginina Vasopressina (AVP)

O nível de AVP foi determinado na eminência média por radioimunoensaio, como descrito no Kit Arginine Vasopressin DSL-1800 (Diagnostic System laboratories, Inc. Webster, Texas, 77598-4217, USA). A sensibilidade da curva desse ensaio foi 0,7pg/ml, para 91% de ligação, com coeficiente de variação intra-ensaio de <5%.

3.10. ANÁLISE HISTOLÓGICA

Após completado o experimento, os animais mortos por decapitação tinham os cérebros e medulas removidos imediatamente, fixados em 4% de paraformaldeído em PBS, embebidos em parafina e cortados a 5µm em secções coronais coradas com Hematoxilina e Eosina (HE). Cada sítio de injeção foi localizado tomando-se como referência o atlas de PAXINOS & WATSON (1992). O grau de lesão foi também avaliado segundo os achados histopatológicos do infiltrado inflamatório na mielina encefálica e medular, através da classificação descrita por JONES *et al.*, 1990 (anexo 1).

3.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Para comparar os grupos entre si, quando existe a normalidade dos dados, utilizamos a análise de variância (ANOVA), que testa a igualdade das médias entre os grupos. Quando a análise de variância indica que existe diferença das médias com relação aos grupos, podemos aplicar alguns testes para verificar quais grupos devem ser considerados diferentes (Teste de Tukey).

Para testar a normalidade dos dados utilizamos o teste de Shapiro-Wilk (programa: SAS 6.12).

Quando não existe normalidade dos dados, para comprovar se os grupos são diferentes entre si com relação às variáveis de interesse, utilizamos o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Quando a diferença entre os grupos (no geral) for significativa (p-valor ≤ 0.05), é feita a comparação entre os grupos, dois a dois. Os grupos serão considerados diferentes quando o p-valor for ≤ 0.05 .

Para explicar a variabilidade do peso em função dos fatores grupo e dias, utilizou-se a Análise de Variância com medidas repetidas, que define o seguinte modelo:

$$\text{Peso} = \mu + \text{Grupo}_i + \text{Dia}_j + \text{Grupo} * \text{Dia}_{ij}$$

onde: μ é o valor médio do peso;

Grupo_i é o efeito dos grupos;

Dia_j é o efeito do dia (1 a 15 dias);

$\text{Grupo} * \text{Dia}_{ij}$ é o efeito da interação entre grupo (i) e dia (j);

Através da significância de cada efeito com relação ao peso, pode-se dizer se existe diferença entre os grupos, ou entre os dias. Quando a interação é significativa, realiza-se o teste de comparação (Teste de Tukey) entre as médias dos níveis de um fator para cada nível do outro fator.

Para comparar os escores clínicos entre os grupos foi utilizado o teste de associação Exato de Fisher.

4.RESULTADOS

4.1. EVOLUÇÃO CLÍNICA DOS ANIMAIS COM EAE

Os sinais clínicos da EAE apareceram entre 11 a 14 dias após a imunização com a emulsão encefalitogênica, onde todos os ratos mostraram uma acentuada perda de peso, quando da instalação dos sinais clínicos (fig.4, anexo2). Houve também uma perda de peso discreta e efêmera, que ocorreu no dia subsequente à imunização, cuja recuperação foi rápida (figura 4, anexo2).

Os animais injetados apenas com o adjuvante de Freund tiveram apenas uma pequena perda de peso, sem desenvolver os sinais clínicos da doença.

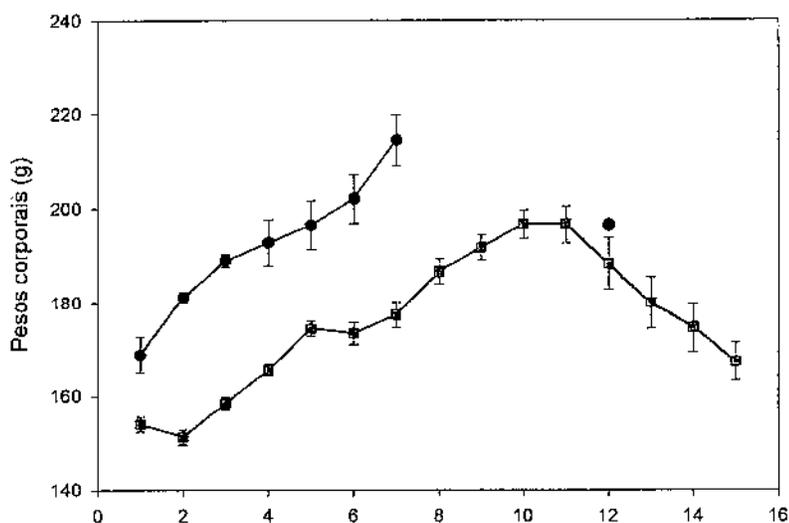


Figura 4A: Evolução dos pesos corporais de ratos normais (LwN) (—●—) e com EAE-controle (EAEC) (—□—).

● indica diferença significativa intra-grupos, teste de Tuckey ($p < 0,05$).

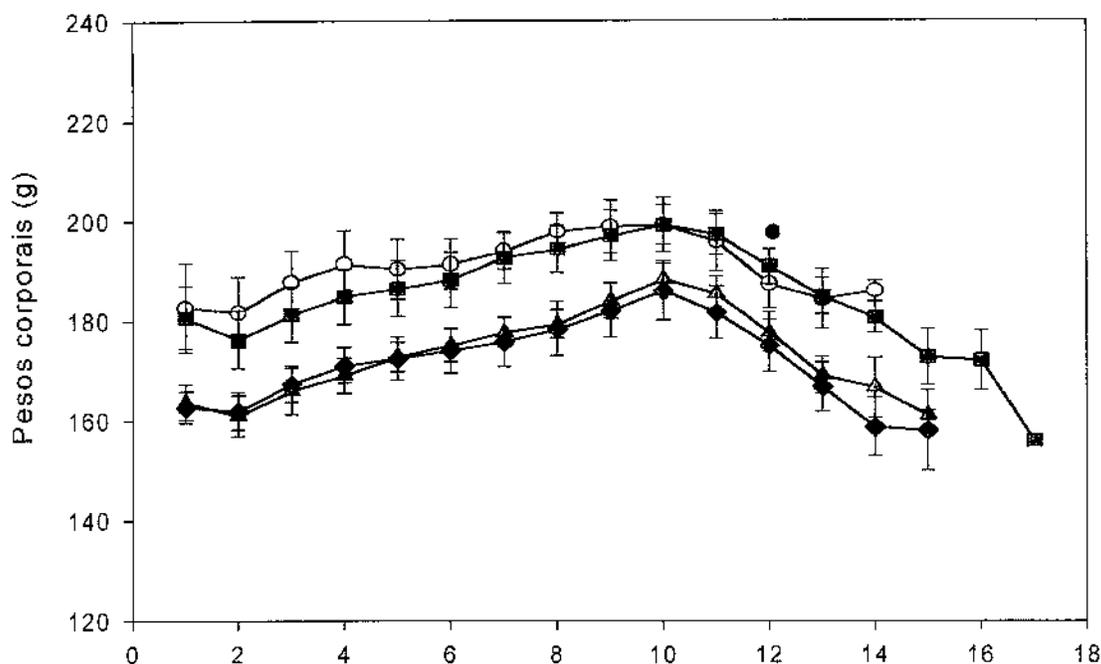


Figura 4B: Evolução dos pesos corporais de ratos com EAE tratados com salina (EAES) (—○—), substância P (EAESP) (—■—), antagonista da SP + salina (EAESnS) (—▲—), antagonista da SP + SP (EAESnSP) (—◆—).

● indica diferença significativa intra-grupos, teste de Tuckey ($p < 0,05$).

A evolução clínica subsequente seguiu o padrão já descrito anteriormente, avaliada e classificada segundo a escala de MC FARLIN *et al.* (1974), com um escore clínico variando de 0,5 a 5, nesses grupos em questão. Esses dados são melhor ilustrados na tabela 1.

Portanto, os primeiros sinais clínicos da doença, muito discretos no início, foram observados a partir do 11º dia, sob a forma de uma hipotonia da cauda, seguida de um agravamento em algumas horas até o 14º dia, quando então apresentavam, seqüencialmente, plegia da cauda, paraparesia e paraplegia, inicialmente assimétrica e, posteriormente, simétrica, seguidas de incontinência urinária e fecal, no estágio 5 da doença.

Tabela 1: Escore clínico de ratos Lewis machos com EAE nos diferentes grupos experimentais

Escore clínico	Grupos experimentais				
	EAEC	EAES	EAESP	EAEAnS	EAEAnSP
	(n=6)	(n=6)	(n=8)	(n=6)	(n=6)
Leve	0,5 e 1(0)	0,5 e 1(1)	0,5 e 1(1)	0,5 e 1(2)	0,5 e 1(2)
Moderado	2 e 3 (2)	2 e 3(4)	2 e 3(7)	2 e 3(4)	2 e 3(3)
Grave	4 e 5(4)	4 e 5(1)	4 e 5(0)	4 e 5(0)	4 e 5(1)
Pré-mórbido	5,5 e 6(0)	5,5 e 6(0)	5,5 e 6(0)	5,5 e 6(0)	5,5 e 6(0)

(): n^o de ratos

Ratos-controle apresentaram escore clínico zero.



Figura 5: Rato com EAE com sinais clínicos leves, mostrando em detalhe a plegia da cauda, patas traseiras edemaciadas, mas sem atrofia muscular (escore clínico 1).

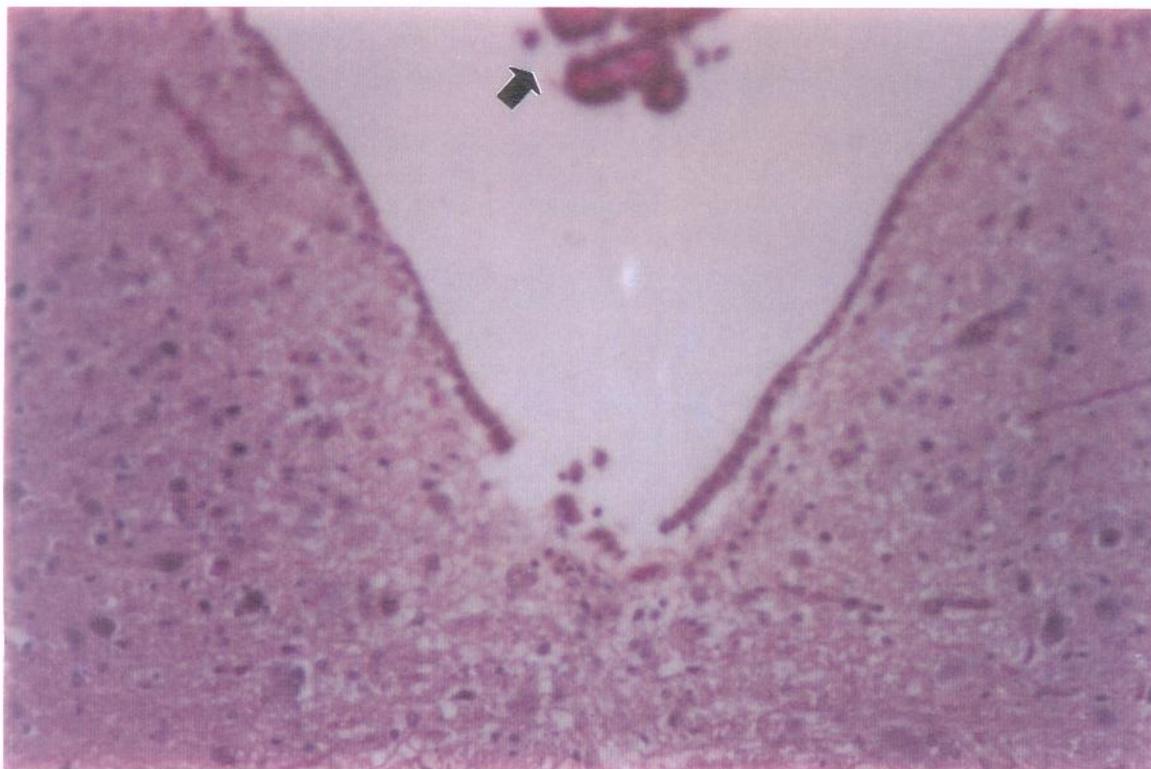


Figura 6: Rato com EAE com sinais clínicos graves, mostrando em detalhe a plegia da cauda e a paraplegia, marcada por intensa atrofia muscular e edema de patas traseiras (escore clínico 5).

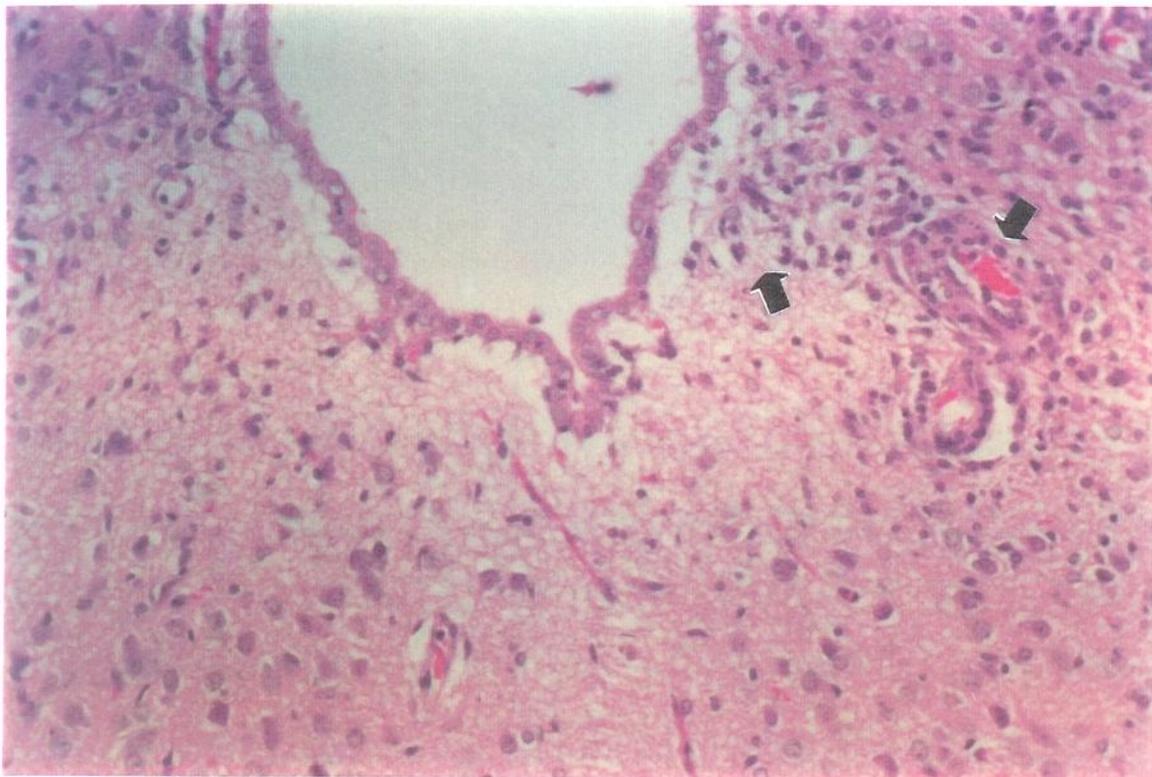
4.2. ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS

O grau de lesão foi também avaliado segundo os achados histopatológicos do infiltrado inflamatório periventricular nas regiões encefálica e medular, segundo a classificação anteriormente descrita (Figura 7).

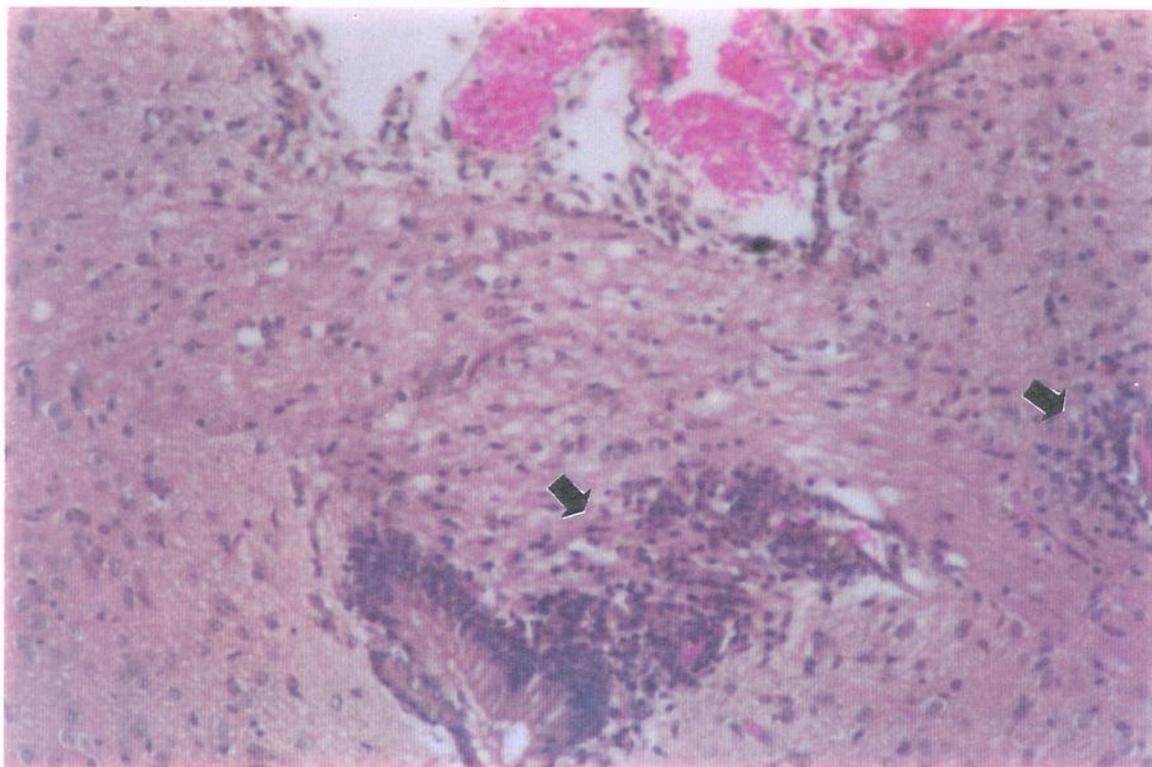
Figura 7: Cortes histopatológicos de ratos normais e com EAE no pico dos sinais clínicos da doença. Os ratos foram imunizados com 0,1mg de PBM e 0,1ml de ACF, contendo 0,5mg de *Micobacterium tuberculosis*.



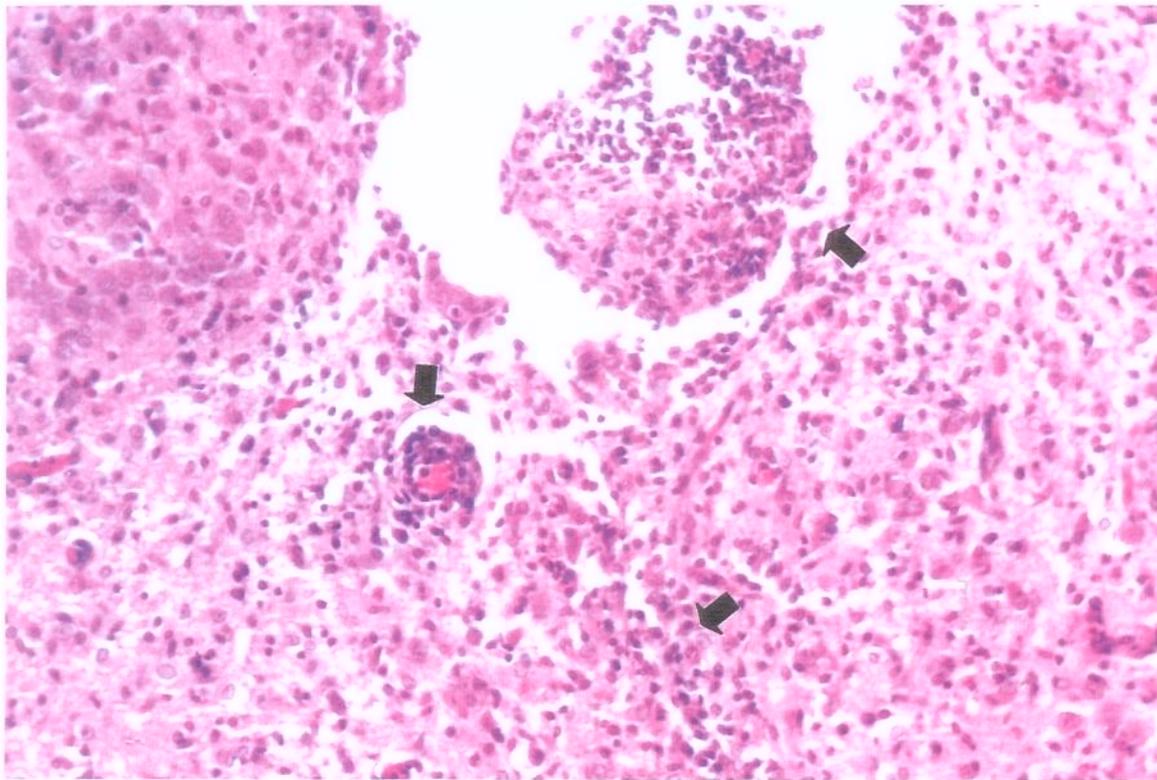
Em A: Corte histológico de cérebro de rato normal, mostrando as margens ventriculares do ventrículo lateral sem infiltrado inflamatório. Em detalhe(seta), a presença do plexo coróide (HE: x110).



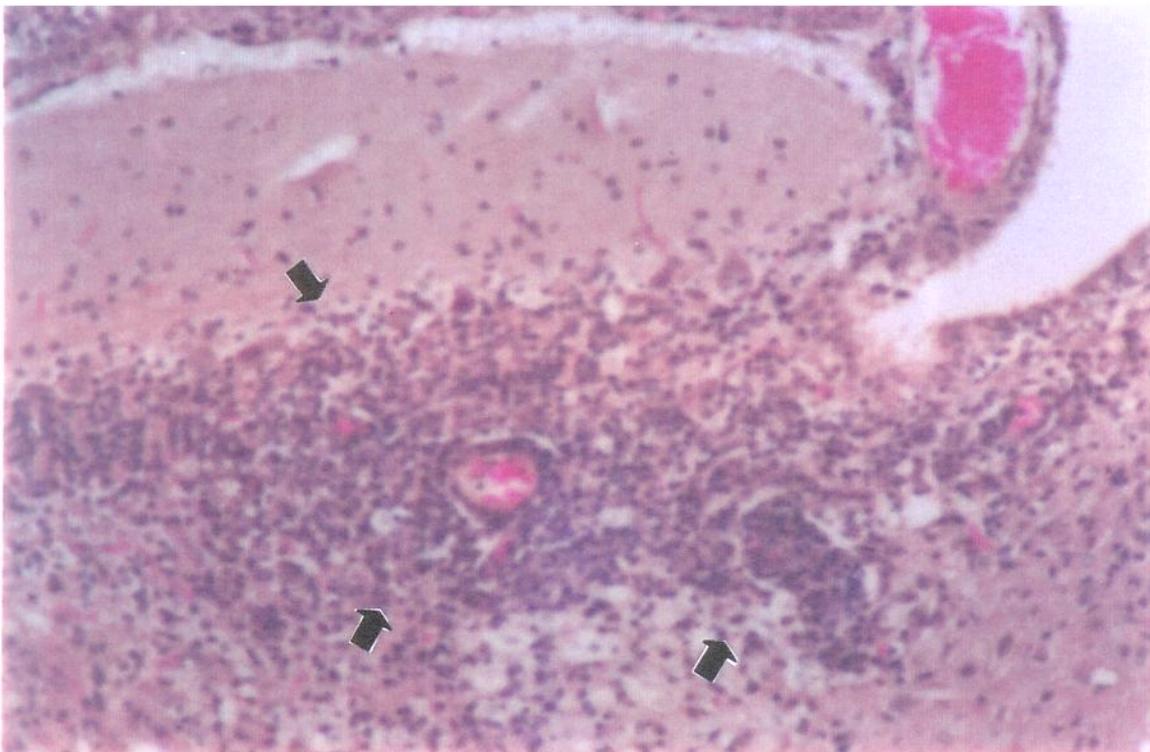
Em B: Corte histopatológico de cérebro de rato com EAE, mostrando as margens ventriculares do ventrículo lateral com infiltrado inflamatório leve. Nota-se a presença desse infiltrado periventricular e perivascular (setas) (escore histopatológico de 2).(HE: x110)



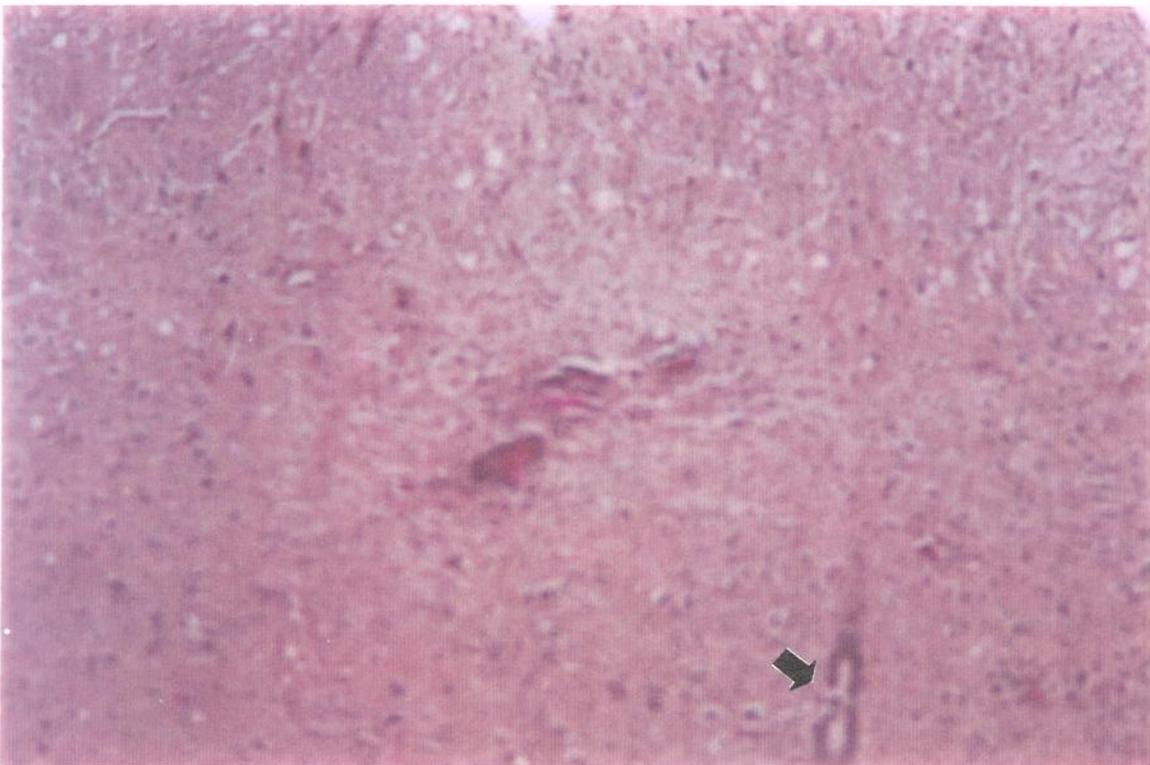
Em C: Corte histopatológico de cérebro de rato com EAE, mostrando, em detalhe, um infiltrado inflamatório periventricular e outro perivenular (setas) (escore histopatológico de 2) (HE: x110).



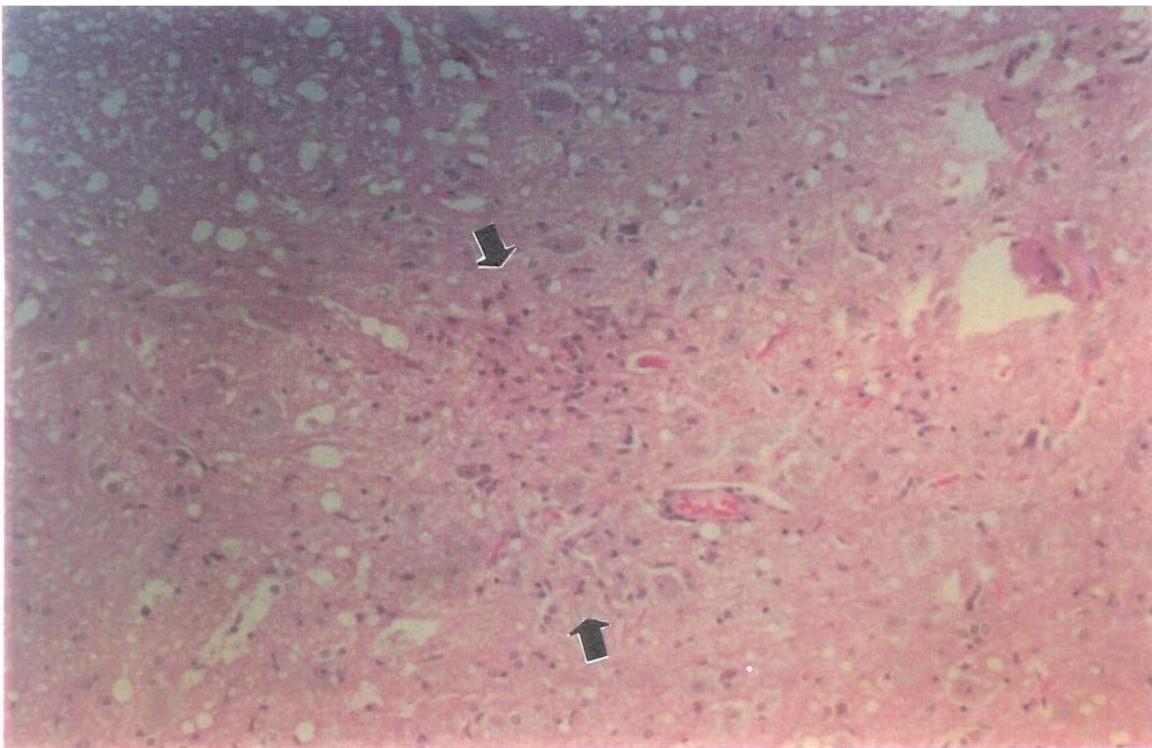
Em D: Corte histopatológico de cérebro de rato com EAE, mostrando as margens ventriculares do ventrículo lateral com infiltrado inflamatório intenso difusamente distribuído. As setas mostram as áreas mais acometidas (periventricular e perivascular). Nota-se, também, uma destruição da citoarquiteta normal do tecido em função do intenso processo inflamatório. (escore histopatológico de 4) (HE x 110).



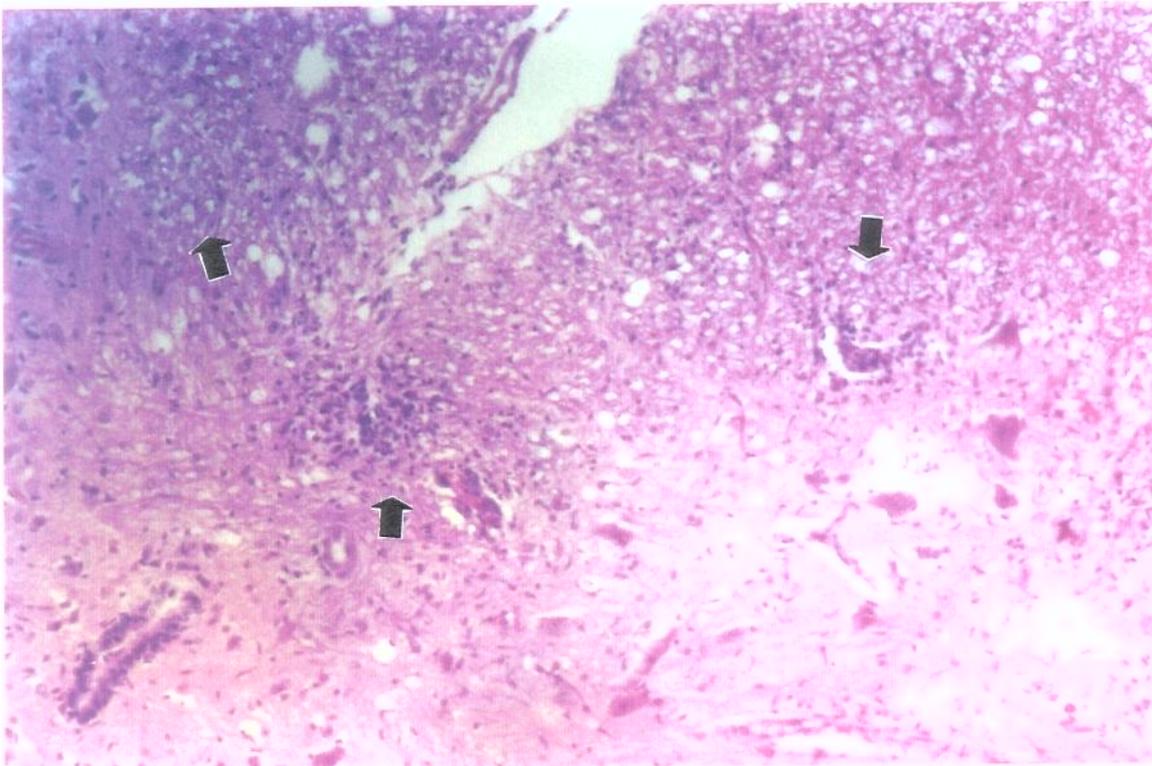
Em E: Corte histopatológico de cerebelo de rato com EAE, mostrando infiltrado inflamatório intenso difusamente distribuído (setas) (score histopatológico de 3) (HE: x110).



Em F: Corte histológico da medula de rato normal, sem infiltrado inflamatório. Em detalhe (seta), o canal central da medula (HE: x110).



Em G: Corte histopatológico da medula de rato com EAE, mostrando infiltrado inflamatório leve (setas) (escore histopatológico de 2) (HE: x110).



Em H: Corte histopatológico de medula de rato com EAE, mostrando infiltrado inflamatório intenso, com alteração da citoarquitetura tecidual (setas) (escore histopatológico de 4) (HE: x110).

4.3. ATIVIDADE CITOTÓXICA NK EM BAÇOS DE RATOS NORMAIS E COM EAE

Definida a condição do aparecimento dos sinais clínicos, os ratos foram sacrificados, sendo seus baços usados para a análise da atividade citotóxica NK, utilizando-se como valores basais os ratos não imunizados. Os ratos injetados apenas com o adjuvante de Freund, apesar de não desenvolverem a doença, foram sacrificados por volta do 16º dia, período máximo esperado para o seu desenvolvimento.

A atividade NK de células de baço de ratos-controle com EAE foi significativamente menor que nos controles normais (LwN) [F (5, 32) = 8,08, $p < 0,001$] (fig.8). Essa atividade aumentou significativamente em ratos EAE tratados com salina (EAES), quando comparada aos controles EAE (EAEC) ($p < 0,05$). Nos grupos simulados (SmS e SmSP), essa atividade foi significativamente menor, quando comparada aos respectivos grupos doentes (EAES e EAESP) [F (4,25) = 10,6, $p < 0,001$] ($p < 0,05$) (fig. 8). A injeção icv da SP não alterou a atividade NK do grupo EAESP, comparada aos ratos-controle EAE, mas os níveis foram menores estatisticamente que os EAE tratados com salina ($p < 0,05$). A atividade NK em ratos que receberam o antagonista da SP seguido da injeção de SP (EAESp), foi significativamente maior que nos controles EAE e nos ratos injetados com SP ($p < 0,05$), mas similar àqueles do grupo de ratos normais.

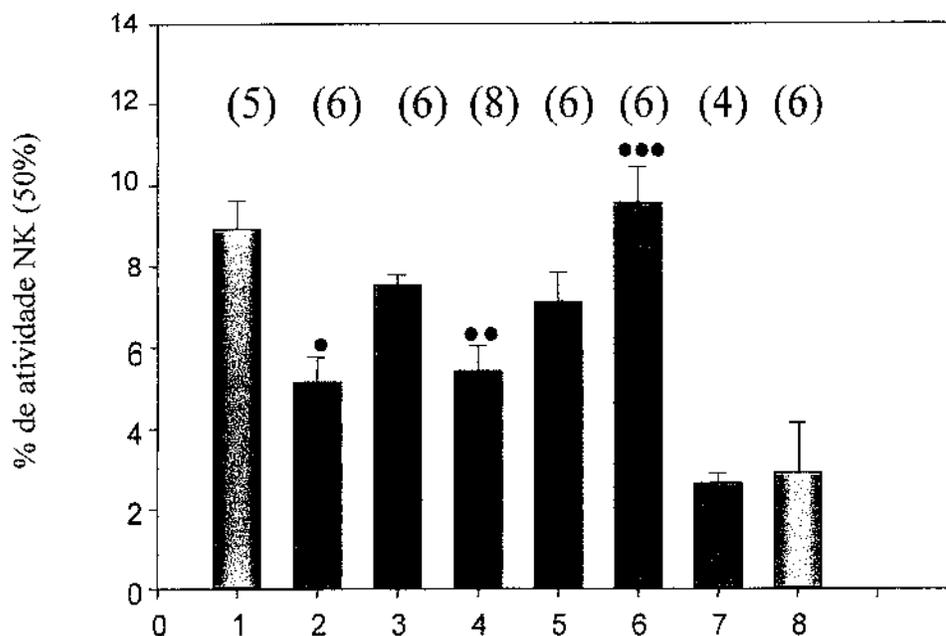


Figura 8: Porcentagem de atividade NK em ratos Lewis machos com encefalomielite alérgica experimental (EAE). Ratos-controle normais [1-LwN (8,9 ± 0,7)], com EAE [2-EAEc (5,2 ± 0,6), 3-EAES (7,6 ± 0,2), 4-EAESP (5,4 ± 0,6), 5-EAEAnS (7,1 ± 0,7), 6-EAEAnSP (9,6 ± 0,9)] e simulados [7-SmS (2,7 ± 0,2) e 8-SmSP (2,9 ± 1,2)] foram distribuídos ao longo das colunas. Salina (S), Substância P (SP) e antagonista (An) foram dados i.c.v. As colunas são as médias ± E.P.M. do n° de ratos indicados nos parâmetros de cada coluna.

●p<0,05, indica diferença significativa entre os grupos da coluna 2 vs colunas 1 e 3 (teste de Tuckey) .

●●p<0,05, indica diferença significativa entre os grupos da coluna 4 vs colunas 3,7 e 8 (teste de Tuckey) .

●●●p<0,05, indica diferença significativa entre os grupos da coluna 6 vs coluna 4 (teste de Tuckey) .

4.4. ANÁLISE DA CITOMETRIA DE FLUXO DE CÉLULAS NK E SUBTIPOS T CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, E NKT NOS BAÇOS DE RATOS NORMAIS E COM EAE

Uma parte dessa mesma solução de células dos baços de ratos normais e com EAE foi utilizada para o ensaio da análise citométrica dos vários subtipos celulares T, NK e NKT (Figuras 9-14).

As células foram marcadas com marcadores de superfície celular de células de camundongo anti-rato para CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ e NKR-P1. A porcentagem de células CD3⁺ no baço aumentou em ratos EAE-controle e foi significativamente maior que no controle normal (LwN), nos ratos EAE que receberam salina (EAES), SP (EAESP) e antagonista da SP seguida da injeção de SP (EAESp) [F (5, 32) = 7,13, p<0,001] (Figura 9). Os demais grupos mostraram valores similares àqueles dos ratos normais. Resultados similares foram obtidos para células CD4⁺ em ratos-controle EAE [F (5, 32) = 9,2, p<0,001] (Figura 10). Entretanto, o nível de células CD4⁺ em ratos EAE tratados com salina foi menor que o nível daqueles que receberam SP (EAESP) (p<0,05) e estatisticamente inferior ao grupo EAESp (p<0,05) (Figura 10). O grupo simulado injetado com salina (SmS) teve uma retenção de células CD4⁺ no baço em relação ao seu correspondente grupo doente (EAES). Na avaliação das células CD8⁺ os ratos tratados com salina ou SP tiveram níveis de células CD8⁺ similares aos dos ratos-controle EAE [F(5,32) = 6,03, p<0,001] (p<0,05) (Figura 11). O grupo simulado salina (SmS) apresentou menor nível de células CD8⁺ no baço que o seu respectivo controle doente (p<0,05) (Figura 11) .

A razão CD4/CD8 foi significativamente menor nos ratos tratados com antagonista da SP seguidos da injeção de SP (EAESp) que aquela do grupo EAE controle, principalmente porque aqueles tiveram mais células CD8⁺ que CD4⁺ no baço [F (5,32) = 4,56, p<0,003] (Figura 12).

A porcentagem fenotípica de células NK (CD3⁺NKR-P1⁺) do baço dos ratos EAE-controle no pico da resposta diferiram dos níveis encontrados nos controles normais, quando analisados separadamente. O antagonista da SP não alterou essa resposta (Figura 13). Os grupos simulados não apresentaram diferenças significativas em relação aos seus respectivos pares doentes.

De acordo com os dados citométricos, ratos-controle EAE, tratados com salina e com SP, tiveram níveis similares de células NKT ($CD3^+NKR-P1^+$), mas os níveis foram significativamente menores nos ratos EAE tratados com o antagonista da SP, quando comparado a esses e ao grupo simulado tratado com SP, indicando um papel para a SP endógena no fluxo migratório dessas células no baço [F (5,32) = 11,27, $p < 0,001$] (Figura 14).

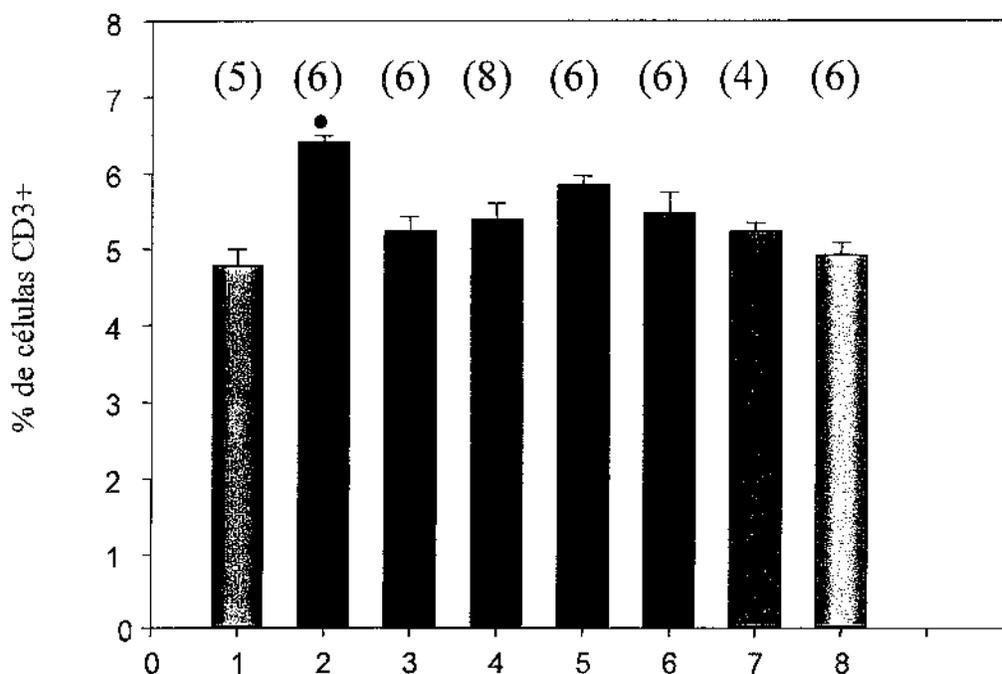


Figura 9: Porcentagem de células T $CD3^+$, em ratos Lewis machos com encefalomielite alérgica experimental (EAE). Ratos-controle normais [1-LwN ($47,8 \pm 2,2$)], com EAE [2-EAEc ($64,2 \pm 0,8$), 3-EAEs ($52,3 \pm 1,8$), 4-EAEsP ($53,9 \pm 2,1$), 5-EAEAnS ($58,6 \pm 1,2$), 6-EAEAnSP ($54,7 \pm 2,7$)] e simulados [7-SmS ($52,3 \pm 1,1$) e 8-SmSP ($49,2 \pm 1,5$)] foram distribuídos ao longo das colunas. Salina (S), Substância P (SP) e antagonista (An) foram dados i.c.v. As colunas são as médias \pm E.P.M. do n^o de ratos indicados nos parâmetros de cada coluna.

• $p < 0,05$, indica diferença significativa entre os grupos da coluna 2 vs colunas 1,3,4 e 6 (teste de Tuckey) .

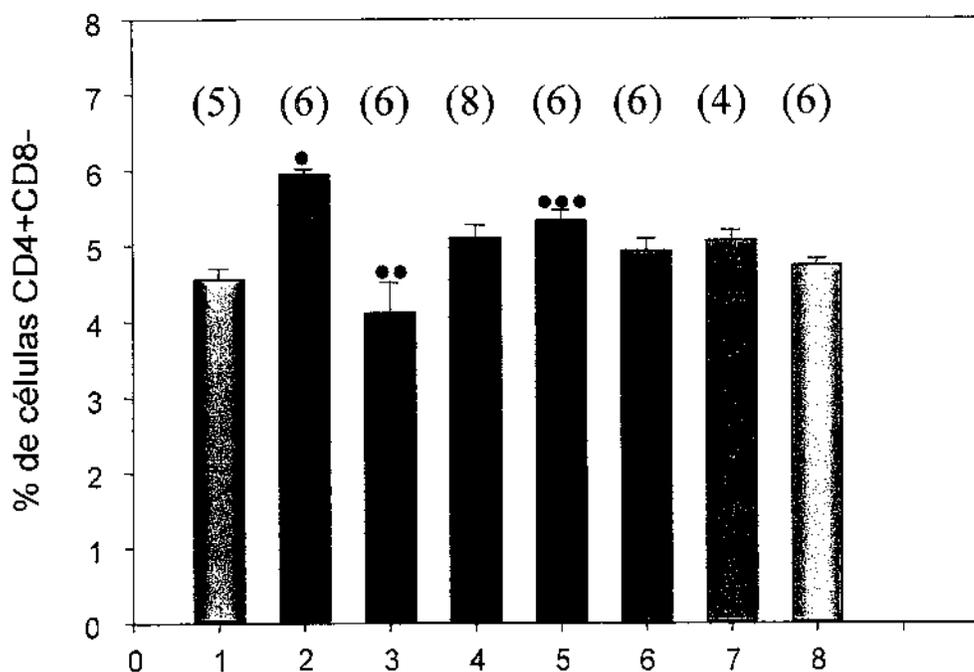


Figura 10: Porcentagem de células T CD4⁺, em ratos Lewis machos com encefalomielite alérgica experimental (EAE). Ratos-controle normais [1-LwN (45,6 ± 1,3)], com EAE [2-EAEc (59,6 ± 0,6), 3-EAES (41,2 ± 4,0), 4-EAESP (51,3 ± 1,7), 5-EAEAnS (53,4 ± 1,3), 6-EAEAnSP (49,4 ± 1,5)] e simulados [7-SmS (50,7 ± 1,3) e 8-SmSP (47,4 ± 0,8)] foram distribuídos ao longo das colunas. Salina (S), Substância P (SP) e antagonista (An) foram dados i.c.v. As colunas são as médias ± E.P.M. do n° de ratos indicados nos parâmetros de cada coluna.

•p<0,05, indica diferença significativa entre os grupos da coluna 2 vs colunas 1,3,4 e 6 (teste de Tuckey).

••p<0,05, indica diferença significativa entre os grupos da coluna 3 vs colunas 4 e 5 (teste de Tuckey).

•••p<0,05, indica diferença significativa entre os grupos da coluna 5 vs coluna 3 (teste de Tuckey).

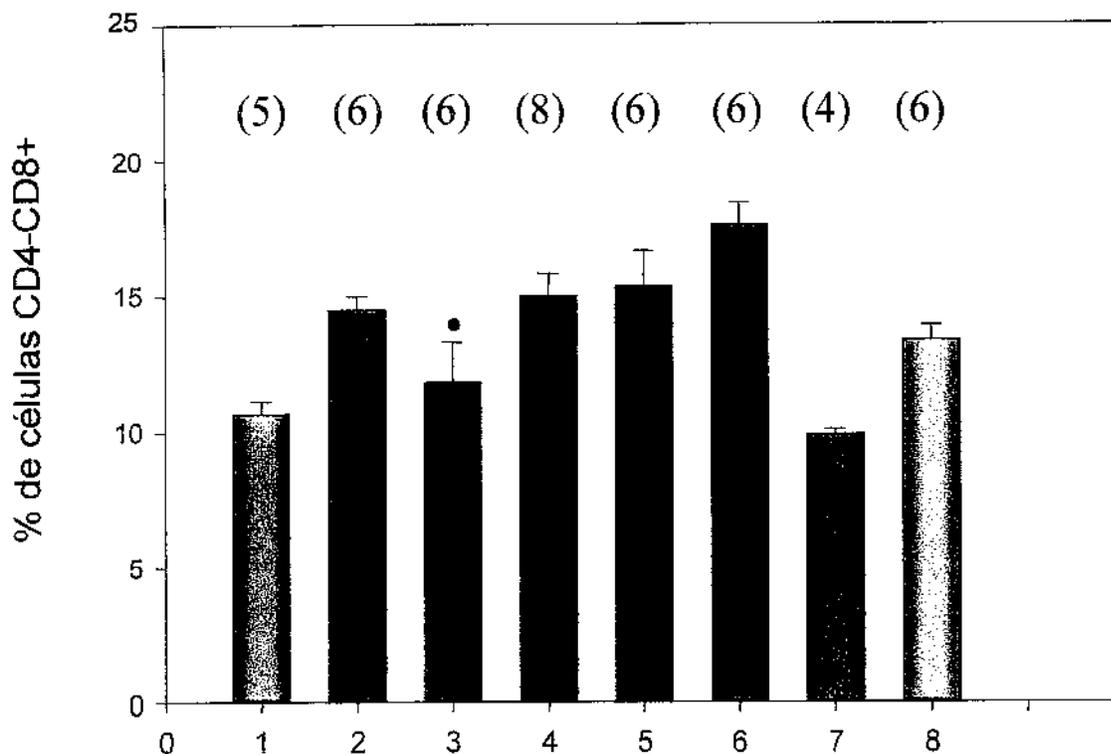


Figura 11: Porcentagem de células T CD8⁺, em ratos Lewis machos com encefalomielite alérgica experimental (EAE). Ratos-controle normais [1-LwN (10,7 ± 0,4)], com EAE [2-EAEc (14,5 ± 0,5), 3-EAES (11,8 ± 1,5), 4-EAESP (15,0 ± 0,8), 5-EAEAnS (15,4 ± 1,3), 6-EAEAnSP (17,7 ± 0,8)] e simulados [7-SmS (9,9 ± 0,2) e 8-SmSP (13,4 ± 0,5)] foram distribuídos ao longo das colunas. Salina (S), Substância P (SP) e antagonista (An) foram dados i.c.v. As colunas são as médias ± E.P.M. do n^o de ratos indicados nos parâmetros de cada coluna.

•p<0,05, indica diferença significativa entre os grupos da coluna 3 vs coluna 5 (teste de Tuckey).

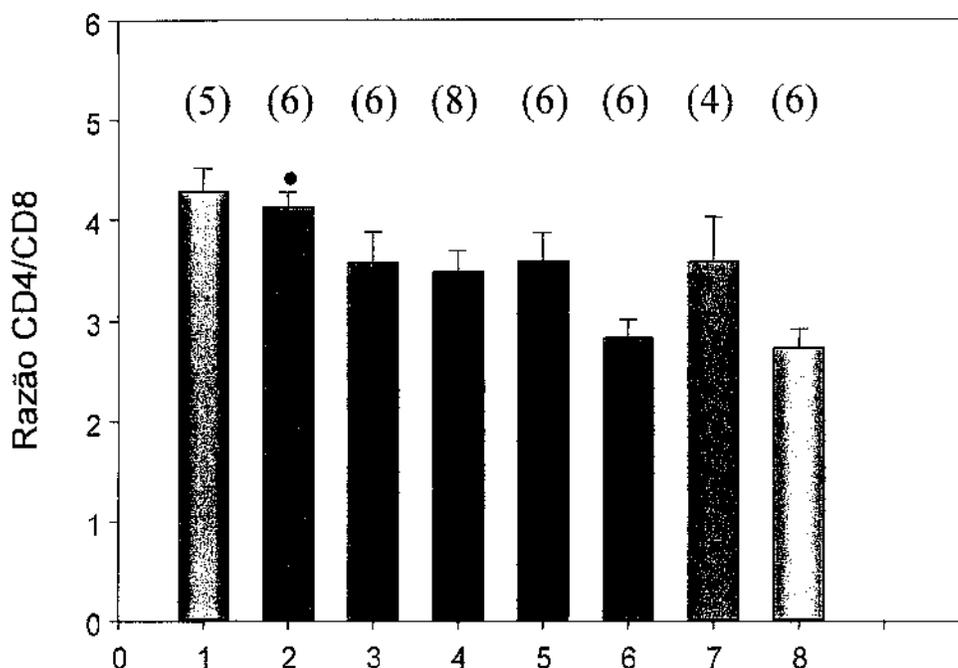


Figura 12: Razões de células T CD4/CD8 em ratos Lewis machos com encefalomielite alérgica experimental (EAE). Ratos-controle normais [1-LwN ($4,3 \pm 0,2$)], com EAE [2-EAEc ($4,1 \pm 0,1$), 3-EAES ($3,6 \pm 0,3$), 4-EAESp ($3,5 \pm 0,2$), 5-EAEAnS ($3,6 \pm 0,3$), 6-EAEAnSP ($2,8 \pm 0,2$)] e simulados [7-SmS ($3,6 \pm 0,4$) e 8-SmSP ($2,7 \pm 0,2$)] foram distribuídos ao longo das colunas. Salina (S), Substância P (SP) e antagonista (An) foram dados i.c.v. As colunas são as médias \pm E.P.M. do n° de ratos indicados nos parâmetros de cada coluna.

• $p < 0,05$, indica diferença significativa entre os grupos da coluna 2 vs coluna 6 (teste de Tuckey).

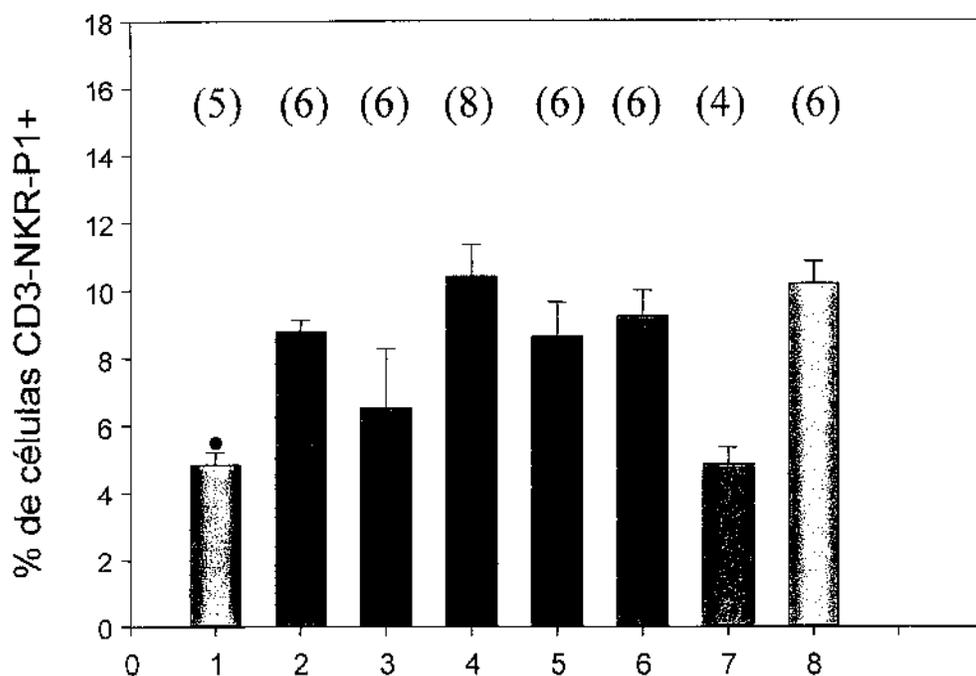


Figura 13: Porcentagem de células CD3⁺NKR-P1⁺ em ratos Lewis machos com encefalomielite alérgica experimental (EAE). Ratos-controle normais [1-LwN (4,9 ± 0,4)], com EAE [2-EAEc (8,8 ± 0,3), 3-EAES (6,5 ± 1,7), 4-EAESP (10,4 ± 0,9), 5-EAEAnS (8,7 ± 1,0), 6-EAEAnSP (9,3 ± 0,7)] e simulados [7-SmS (4,9 ± 0,5) e 8-SmSP (10,2 ± 0,6)] foram distribuídos ao longo das colunas. Salina (S), Substância P (SP) e antagonista (An) foram dados i.c.v. As colunas são as médias ± E.P.M. do n^o de ratos indicados nos parâmetros de cada coluna.

•p<0,05, indica diferença significativa entre os grupos da coluna 1 vs coluna 2 (teste de Tuckey) .

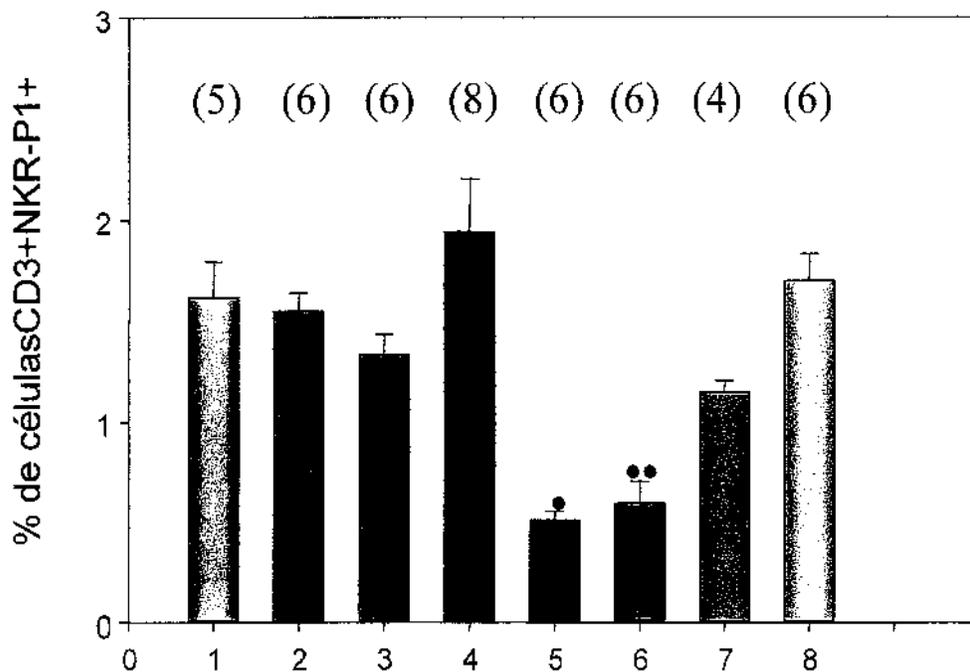


Figura 14: Porcentagem de células $CD3^+NKR-P1^+$ em ratos Lewis machos com encefalomielite alérgica experimental (EAE). Ratos-controle normais [1-LwN ($1,6 \pm 0,2$)], com EAE [2-EAEc ($1,6 \pm 0,1$), 3-EAES ($1,3 \pm 0,1$), 4-EAESP ($1,9 \pm 0,3$), 5-EAEAnS ($0,5 \pm 0,04$), 6-EAEAnSP ($0,6 \pm 0,1$)] e simulados [7-SmS ($1,2 \pm 0,1$) e 8-SmSP ($1,7 \pm 0,1$)] foram distribuídos ao longo das colunas. Salina (S), Substância P (SP) e antagonista (An) foram dados i.c.v. As colunas são as médias \pm E.P.M. do n^o de ratos indicados nos parâmetros de cada coluna.

• $p < 0,05$, indica diferença significativa entre os grupos da coluna 5 vs coluna 3 (teste de Tuckey) .

•• $p < 0,05$, indica diferença significativa entre os grupos da coluna 6 vs colunas 4 (teste de Tuckey) .

4.5. ANÁLISES HORMONAIS

As dosagens hormonais de ACTH e corticosterona foram realizadas a partir do plasma e do AVP da eminência média desses animais. Foram consideradas como valores basais das mesmas as dosagens do grupo dito controle normal.

Ratos EAE tiveram níveis de ACTH maiores que os controles [$F(5,32) = 3,45$, $p < 0,01$]. A SP reduziu os níveis de ACTH ($p < 0,05$), em relação aos grupos EAEC e EAES e esse efeito foi revertido para níveis similares ao do grupo EAES em ratos injetados com o antagonista da SP seguidos da injeção de SP (EAESnSP) ($p < 0,05$) (Figura 15). Na análise dos grupos doentes em relação aos simulados, os animais doentes tratados com salina tiveram níveis maiores de ACTH em relação aos grupos simulados [$F(4,25) = 7,2$, $p < 0,001$] ($p < 0,05$). As mudanças nos níveis de corticosterona foram similares àquelas para o ACTH [$F(5,32) = 5,15$, $p < 0,001$], porém os grupos simulados apresentaram baixos níveis de corticosterona em relação aos seus respectivos pares doentes. (Figura 16). Não houve mudanças significantes nos níveis de AVP em nenhum dos grupos (Figura 17).

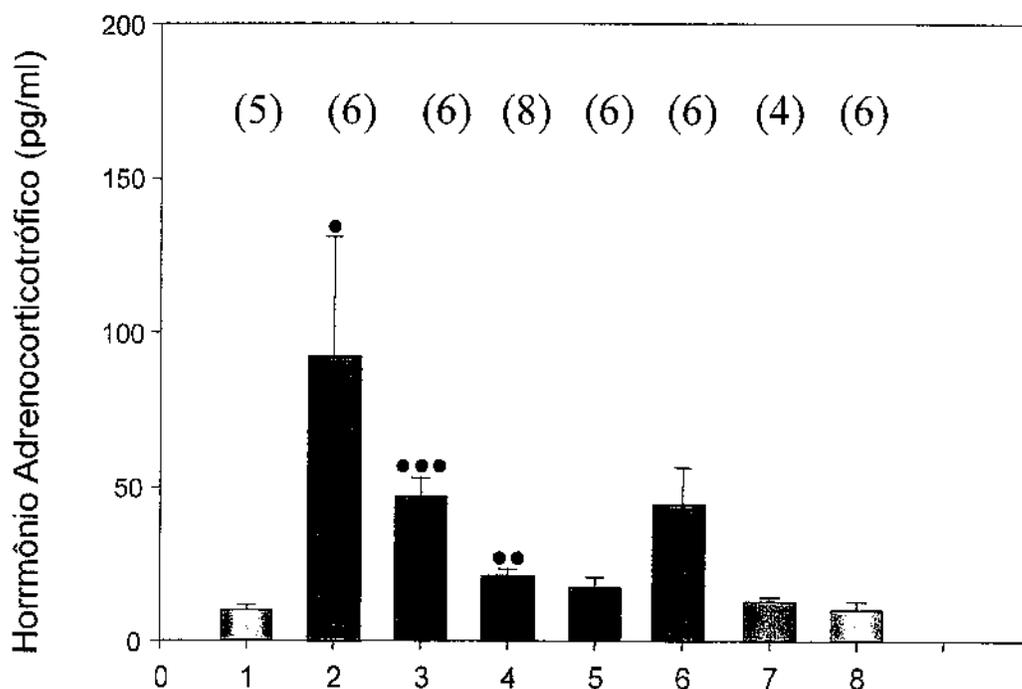


Figura 15: Nível de hormônio adrenocorticotrófico em ratos Lewis machos com encefalomielite alérgica experimental (EAE). Ratos-controle normais [1-LwN ($10,2 \pm 1,5$)], com EAE [2-EAEc ($92,2 \pm 38,5$), 3-EAES ($47,1 \pm 6,1$), 4-EAESP ($21,3 \pm 2,3$), 5-EAEAnS ($17,9 \pm 3,0$), 6-EAEAnSP ($44,8 \pm 11,8$)] e simulados [7-SmS ($13,3 \pm 1,2$) e 8-SmSP ($10,4 \pm 2,6$)] foram distribuídos ao longo das colunas. Salina (S), Substância P (SP) e antagonista (An) foram dados i.c.v. As colunas são as médias \pm E.P.M. do n^o de ratos indicados nos parâmetros de cada coluna.

• $p < 0,05$, indica diferença significativa entre os grupos da coluna 2 vs coluna 1 (teste de Tuckey) .

•• $p < 0,05$, indica diferença significativa entre os grupos da coluna 4 vs colunas 2,3 e 6 (teste de Tuckey) .

••• $p < 0,05$, indica diferença significativa entre os grupos da coluna 3 vs colunas 7 e 8 (teste de Tuckey) .

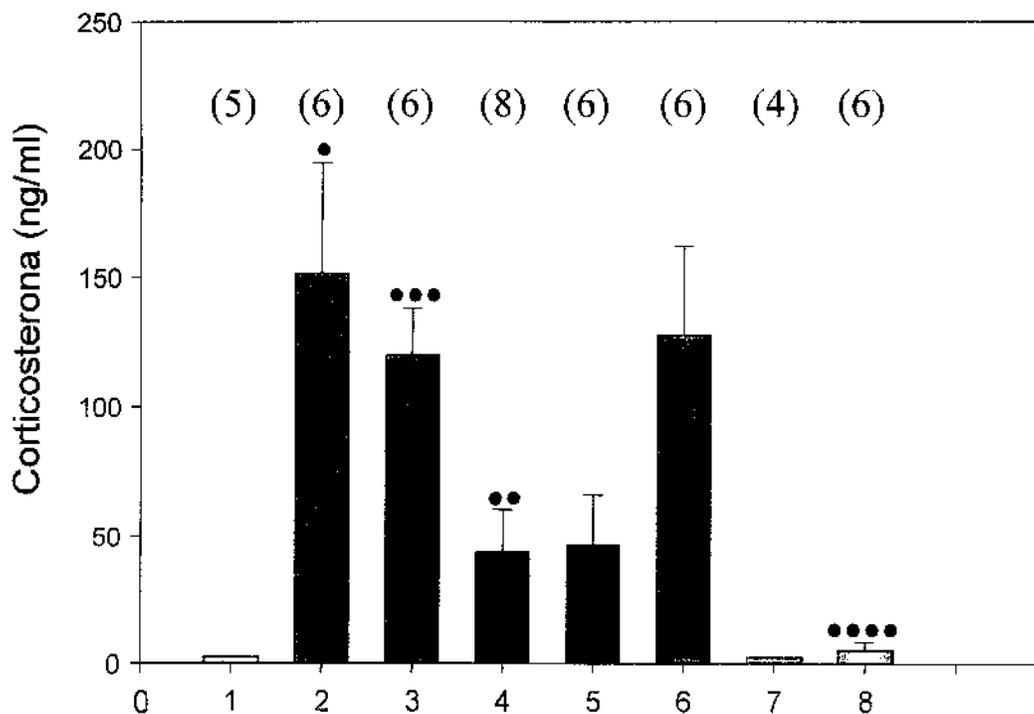


Figura 16: Nível de corticosterona em ratos Lewis machos com encefalomielite alérgica experimental (EAE). Ratos-controle normais [1-LwN ($2,2 \pm 0$)], com EAE [2-EAEc ($152,1 \pm 42,5$), 3-EAES ($120,3 \pm 17,8$), 4-EAESP ($44,0 \pm 16,2$), 5-EAEAnS ($46,9 \pm 19,3$), 6-EAEAnSP ($128,4 \pm 34,1$)] e simulados [7-SmS ($2,2 \pm 0$) e 8-SmSP ($5,3 \pm 3,1$)] foram distribuídos ao longo das colunas. Salina (S), Substância P (SP) e antagonista (An) foram dados i.c.v. As colunas são as médias \pm E.P.M. do n^o de ratos indicados nos parâmetros de cada coluna.

● $p < 0,05$, indica diferença significativa entre os grupos da coluna 2 vs coluna 1 (teste de Tuckey).

●● $p < 0,05$, indica diferença significativa entre os grupos da coluna 4 vs colunas 2,3 e 6 (teste de Tuckey).

●●● $p < 0,05$, indica diferença significativa entre os grupos da coluna 3 vs coluna 7 (teste de Tuckey).

●●●● $p < 0,05$, indica diferença significativa entre os grupos da coluna 8 vs coluna 4 (teste de Tuckey).

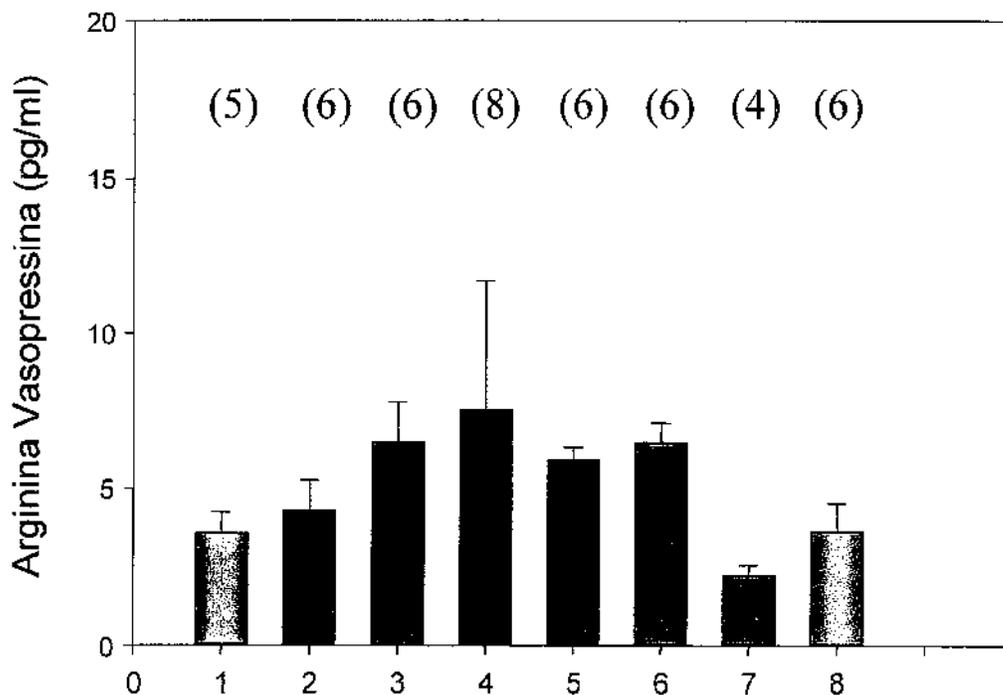


Figura 17: Nível de arginina vasopressina em ratos Lewis machos com encefalomielite alérgica experimental (EAE). Ratos-controle normais [1-LwN ($3,6 \pm 0,7$)], com EAE [2-EAEc ($4,3 \pm 1,0$), 3-EAES ($6,5 \pm 1,3$), 4-EAESp ($7,2 \pm 3,4$), 5-EAEAnS ($5,9 \pm 0,4$), 6-EAEAnSP ($6,5 \pm 0,6$)] e simulados [7-SmS ($2,3 \pm 0,3$) e 8-SmSP ($3,7 \pm 0,9$)] foram distribuídos ao longo das colunas. Salina (S), Substância P (SP) e antagonista (An) foram dados i.c.v. As colunas são as médias \pm E.P.M. do n^o de ratos indicados nos parâmetros de cada coluna.

Não houve diferenças significativas entre os grupos .

5.DISSCUSSÃO

De posse de conhecimentos bem estabelecidos na literatura sobre o papel da SP na modulação do eixo HHA frente a quadros de estresse crônico, foi proposta deste trabalho investigar a participação desse neuropeptídeo na modulação dos processos imunopatológicos de um modelo experimental de estresse inflamatório crônico conhecido como EAE, o modelo animal mais fidedigno para o estudo da EM.

5.1. DA EVOLUÇÃO CLÍNICA AOS SINAIS HISTOPATOLÓGICOS:

Assim que aparecem as primeiras manifestações clínicas da doença, as lesões periventriculares se instalam, traduzindo um edema vasogênico pela presença da ruptura da BHE. A intensidade da ruptura da BHE e do volume do edema vasogênico traduz o aumento do teor de água no tecido (HIRAKAWA *et al.*, 1984), o qual é concordante com o agravamento da doença (NAMER *et al.*, 1992). Essas alterações demonstram o papel importante da ruptura da barreira que precede e segue a evolução da doença e determina a formação de lesões inflamatórias. Essas são compostas de infiltrados mononucleares perivasculares em todo o sistema nervoso central, mas essencialmente ao nível da medula espinhal e do tronco cerebral (PENDER, 1988; PENDER *et al.*, 1989).

Seja qual for o modelo de EAE utilizado, a ruptura da BHE interessa somente a certas zonas do SNC ditas frágeis (JUHLER, 1988), ou seja, regiões periventriculares, zonas de entrada das raízes dorsais dos nervos cranianos e espinhais, leptomeninges. Isso se deve ao fato de que os linfócitos T sensibilizados à PBM penetram e/ou atacam preferencialmente as células endoteliais dessas regiões frágeis (JUHLER *et al.*, 1984; JUHLER *et al.*, 1985). Trata-se de uma reação não específica ligada às condições anatômicas e reológicas da vascularização dessas regiões (OLSSON, 1968; JELLINGER, 1974; SIMMONS *et al.*, 1982; PENDER & SEARS, 1986; RECHTHAND & RAPOPORT, 1987; PETTERSSON, 1993) ou de uma reação específica entre as células endoteliais dessas regiões e de linfócitos T sensibilizados à PBM.

Portanto, os achados de infiltrados perivasculares, observados nesses animais doentes no pico dos sinais clínicos, não foram estatisticamente significativos entre os ratos tratados ou não com a SP ou com o seu antagonista, demonstrando, portanto, o efeito inerente dessa quebra da BHE e do conseqüente edema vasogênico, como agentes imprescindíveis para a instalação de todo o processo imunoinflamatório local, associado à reação específica dos linfócitos T sensibilizados à PBM. A SP não parece, portanto, ter um efeito direto sobre a gênese dessas placas, embora possa participar da instalação do processo inflamatório, aumentando a permeabilidade dos capilares cerebrais à entrada das células inflamatórias no SNC, pois a recente descoberta de astrócitos imunoreativos à SP nas placas de Esclerose Múltipla (EM) aumenta a possibilidade de que esse peptídeo possa ser importante na história natural da doença (KOSTYK *et al.*, 1989, BARKER *et al.*, 1992).

5.2. MODULAÇÃO DO EIXO HHA

Vários trabalhos têm descrito o papel mediador do CRF e IL-1 na relação entre estresse e imunidade (IRWIN *et al.*, 1987; IRWIN *et al.*, 1990). Exemplificando, IL-1 estimula a síntese de CRF pelo PVN ou a sua liberação pelas terminações neuronais situadas na eminência média, utilizando como mediador a prostaglandina (SAPOLSKY *et al.*, 1987; BERKENBOSH *et al.*, 1987). E mais, CRF central parece ser o principal mediador dos efeitos da IL-1 periférica sobre o eixo HHA (SAPOLSKY *et al.*, 1987; BERNTON *et al.*, 1987), pois receptores de IL-1 são evidenciados no hipocampo, córtex, plexo coróide, hipófise, assim como também receptores para a IL-6 e TNF pelo hipotálamo (HAOUR *et al.*, 1990; KINOCHI *et al.*, 1991; OHMACHI *et al.*, 1992; SCHÖHITZ, VOORHUIS & DE KLOET, 1992).

O órgão vascular da lâmina terminal (OVLT), desprovido de barreira hemato-meníngea, poderia ser o alvo central da IL-1 periférica e o suporte desses efeitos sobre a atividade do eixo hipófise-supra-renal, efetuando-se através das vias:

- plasmática: as citocinas, principalmente a IL-1, circulando pelo OVLT, poderiam ligar-se a receptores sobre as células endoteliais que, em resposta, secretariam, no parênquima cerebral, fatores pró-inflamatórios, como PGs que agiriam sobre neurônios próximos, através de neurotransmissores clássicos, transferindo a informação às células

hipotalâmicas ou hipocâmpicas (KENT, 1992; SCHÖBITZ, REUL & HOLSBOER, 1994). A IL-1 poderia, também, ativar o PVN indiretamente, através da área pré-óptica medial (KATSUURA *et al.*, 1990).

- nervosa: as citocinas teriam uma influência estimulante sobre a expressão de certos fatores do SNP que conduziriam a mensagem por intermédio das fibras sensoriais aferentes ao cérebro (KENT *et al.*, 1992; SCHÖBITZ *et al.*, 1994), diretamente através da via vagal (LILLY & GANN, 1992; FLESHNER *et al.*, 1995; GAYKEMA, DIJKSTRA & TILDERS, 1995).

Argumento em favor de uma síntese cerebral de IL-1 (BREder, DINARELLO, SAPER, 1988) por astrócitos, macrófagos e neurônios, e também de outras citocinas (BANTLOW *et al.*, 1990; BENVENISTE, 1992; SCHÖBITZ *et al.*, 1992), como IL-6 e TNF (sintetizadas por astrócitos e macrófagos) seria a promoção de efeitos evidenciados pela injeção de IL-1 e TNF icv. similares àqueles observados após a administração periférica das mesmas (SHOHAM *et al.*, 1987; SUNDAR *et al.*, 1990; RIVEST, TORRES, RIVIER, 1992). Portanto, a IL-1 cerebral, intervindo como seu próprio mensageiro intermediário, seria o principal mecanismo de coordenação das respostas nervosas e endócrinas à IL-1 periférica (BREder *et al.*, 1988), atuando de uma maneira autócrina ou parácrina (DINARELLO *et al.*, 1987).

Por outro lado, argumento em favor da via nervosa seria sustentado por trabalho mostrando que a IL-1beta, administrada periféricamente, mas não centralmente, seria capaz de induzir um efeito inibitório crônico à liberação da ocitocina, através do estímulo do eixo HHA, elevando o nível de glicocorticóides plasmáticos (HARBUZ *et al.*, 1996).

Os mecanismos que levam a níveis de esteróides elevados na EAE se iniciam provavelmente no núcleo paraventricular do hipotálamo, como resultado de um estresse inflamatório crônico estabelecido, seja pela ação periférica da IL-1, estimulando a síntese de CRF pelo PVN ou a sua liberação pelas terminações neuronais situadas na eminência média (SAPOLSKY *et al.*, 1987; BERKENBOSH *et al.*, 1987; DEL REY, A., KLUSMAN, I., BESEDOVSKY, H.O., 1998; HARBUZ *et al.*, 1995). Na artrite adjuvante, outro tipo de inflamação crônica, o aumento que ocorre nos níveis hormonais deve-se à ativação do eixo HHA, acompanhado de um decréscimo no CRF (HARBUZ *et al.*, 1995). Isto

provavelmente ocorre porque, com o desenvolvimento da doença, há uma perda do ritmo circadiano normal de hormônios circulantes, na qual níveis de ACTH e corticosterona estão aumentados, enquanto níveis de CRF estão reduzidos, mas AVP aumentados (HARBUZ *et al.*, 1995). Quando CRF é inábil em aumentar ACTH plasmático durante esse processo inflamatório crônico, AVP toma a diretriz estimulatória do eixo HHA, possivelmente através do nível aumentado de SP no PVN e na eminência média, o qual aumenta a habilidade do PVN em estimular a síntese de AVP e inibir a de CRF (HARBUZ *et al.*, 1995). Os resultados encontrados neste trabalho para ACTH e corticosterona (fig. 6) estão em acordo com essas e outras publicações, mostrando níveis elevados de ACTH e corticosterona em ratos doentes (HARBUZ *et al.*, 1995; REDER *et al.*, 1994). Isso poderia ser explicado pela secreção da própria IL-1 por linfócitos e monócitos, a nível periférico, ou mesmo central, por astrócitos, células microgliais ou neurônios, fazendo parte da resposta à reação inflamatória e/ou pela sua ação na ativação do eixo hipófise-medula-supra-renal (FONTANA *et al.*, 1982). Por outro lado, não houve aumento do AVP nesse grupo (Figura 12), o que nos leva a pensar que mecanismos etiopatogênicos diferentes regem esses dois tipos de doenças inflamatórias. Embora a vasopressina possa estar aumentada apenas no baço, mas não no timo, de ratos artríticos no 14º dia após a imunização (JESSOP *et al.*, 1995; CHOWDREY *et al.*, 1994), isso não é bem estabelecido na EAE. Contudo, existem trabalhos na literatura que mostram que o AVP não está aumentado em pacientes com EM, onde o número de células imunoreativas ao AVP no PVN desses pacientes não é diferente dos controles (PURBA *et al.*, 1995). Além disso, MICHELSON *et al.* (1994) demonstraram que esses pacientes apresentam respostas não expressivas de ACTH à estimulação com o AVP, com respostas normais de ACTH ao CRH e também ao cortisol, pela estimulação com ACTH a altas e baixas doses. Isso é compatível com a hipótese de que o hipercortisolismo nessa doença é via CRF e não AVP.

Como existem evidências de que a administração de glicocorticóides resulte na perda de receptores de vasopressina pituitários (KOCH & LUTZ-BUCHER, 1985; LUTZ-BUCHER *et al.*, 1986) e que a ativação da secreção de ACTH pela vasopressina é menos sensível à inibição por “feed-back” pelos glicocorticóides que pelo CRH (BILEZIJIAN, BLOUNT, VALE, 1987), é possível que o hipercortisolismo próprio da doença leve a uma inibição dos mecanismos de resposta do AVP nestes ratos.

Ratos injetados com SP (EAESP) i.c.v. mostraram uma queda nos níveis de ACTH e corticosterona (Figura 12) em relação aos ratos injetados com salina, devido, provavelmente, à diminuição do CRH no PVN (FARIA *et al.*, 1991), já que este núcleo é altamente inervado com neurônios contendo SP (MIKKELSON *et al.*, 1989; BITTENCOURT *et al.*, 1991), e também do CRH proveniente de outras áreas, incluindo o sistema catecolaminérgico do tronco cerebral, núcleo arqueado e hipotálamo lateral. Juntamente com a presença de receptores da neurocinina (NK1) em áreas hipotalâmicas (BITTENCOURT *et al.*, 1991), esses dados sustentam evidências neuroanatômicas e funcionais suficientes para uma ação central da SP dentro do eixo HHA. Ela seria inibitória por atuar indiretamente no CRF através do ácido γ -aminobutírico (GABA), presente dentro de neurônios CRF-érgicos do PVN (MEISTER *et al.*, 1988). Por outro lado, o antagonista da SP seguido da injeção de SP reverteu essa queda. Curiosamente, os ratos que receberam o antagonista e salina após (EAEAnS) reproduziram os mesmos resultados que os do grupo injetado com SP (figura 12), indicando uma possível ausência de substância P endógena nessa fase do processo patológico e, por conseqüência, ausência de efeito do antagonista. Portanto, a SP endógena não parece ser significativa nesse processo de doença, tal qual ocorre na AA. Entretanto, no grupo EAEAnSP, a ação do antagonista passou a ser a de um agonista parcial, provavelmente em função de uma super saturação do receptor, por dose elevada, levando a um efeito inibitório por alteração da sua conformação. Há trabalhos que mostram que o antagonista da SP, RP 67580, em relação ao bloqueio dos receptores NK1, exerceria uma ação não relacionada à inibição desses receptores, incluindo uma interação com canais de cálcio e efeitos inibitórios não específicos na neurotransmissão, mecanismo similar àquele dos anestésicos locais (WANG *et al.*, 1994; LOMBERT & SPEDDING, 1994). O fenômeno de sensibilização a doses mais elevadas do RP67580 (>2500pmol) no aumento do ACTH e da corticosterona, induzido pela SP, após a injeção do antagonista, poderia ser decorrente de uma ativação do eixo HHA no grupo EAEAnSP. Isso seria, portanto, o resultado de tais efeitos não específicos do composto na neurotransmissão ou na excitabilidade neuronal em circuitos neurais relacionados à regulação central do eixo. O fato de ter ocorrido uma potencialização central das respostas ao ACTH e à corticosterona pela SP, nesse grupo, administrada após o tratamento com altas doses do antagonista RP 67580, poderia arguir em favor de uma interação não específica do mesmo. A capacidade

diminuída a altas doses do RP67580 em inibir respostas centrais à SP parece ser enantioselectiva e pode resultar de interações do RP67580 com receptores centrais NK1. Portanto, antagonistas não peptídicos atuariam como inibidores alostéricos que alterariam a forma do sítio de ligação de alta afinidade para o agonista natural (GETHER *et al.*, 1993). Se a potencialização da resposta ao eixo HHA resulta de uma interação específica do RP67580 com os receptores NK1 centrais, esses achados sugerem que interações moleculares dessa substância com esses receptores cerebrais sejam dose-dependentes, ou seja, em baixas doses atuariam como antagonistas potentes dos receptores NK1 centrais e em altas doses sensibilizariam esses receptores à SP (CULMAN *et al.*, 1995). Por outro lado, foi utilizada neste estudo a dose de 20 nmol, preconizada por JESSOP *et al.* que utilizaram esta mesma dose do antagonista nos seus trabalhos com estresse agudo de restrição e estresse inflamatório crônico em um modelo de artrite adjuvante e não verificaram tal efeito. No modelo sobre estresse agudo de restrição essa dose mostrou que o antagonista da SP é responsável por níveis tônicos elevados de ACTH e corticosterona séricos e CRH no PVN, mesmo após 4h do término do estresse, sugerindo que a SP endógena não inibe a magnitude inicial da resposta ao eixo HHA ao estresse de restrição, mas atua através dos receptores NK1 a nível central para reduzir a duração da resposta ao estresse.

O efeito do estresse de manipulação adicional, promovido pelas injeções repetitivas nesses animais, não parece ser significativo, haja visto que os grupos simulados tiveram níveis de ACTH e corticosterona semelhantes ao grupo controle normal (LwN), corroborando com a hipótese de um mecanismo de adaptação ao estresse de manipulação, onde o eixo HHA permanece menos sensível ao estresse homotípico, devido ao aumento na produção de SP por estímulo no PVN (HARBUSZ *et al.*, 1995).

Portanto, podemos postular que a SP possa ter um efeito modulador nesse processo inflamatório da EAE, embora não diretamente, mas através do eixo HHA, com conseqüente ativação da glândula adrenal ou do sistema simpático, atuando diretamente ao nível dos órgãos linfóides, controlando, por exemplo, o tráfego celular nos mesmos.

Embora o papel para a SP ainda não esteja bem definido na EAE, alguns autores investigaram o papel das fibras nervosas da NA e da SP dentro de linfonodos na

artrite auto-imune alérgica experimental (AA) em ratos Lewis, demonstrando que a denervação química por 6-OHDA promove um início precoce e severidade aumentada do processo artrítico, enquanto a denervação das fibras nervosas da SP com capsaicina, nos mesmos, resultou em um início retardado e severidade diminuída dessas mudanças inflamatórias, sugerindo que essas possam modular o tempo de início do curso e a severidade da AA em ratos Lewis (FELTEN *et al.*, 1992).

5.3. ESTRESSE INFLAMATÓRIO COMO FATOR DE MUDANÇAS NO PESO CORPORAL

A queda de peso constatada nos animais doentes, principalmente no início dos sintomas clínicos, deve-se provavelmente aos mecanismos do estresse inflamatório, acima referidos, ao qual os animais foram submetidos. Nesse caso em particular, o estresse foi de natureza mista, física, devido à reação imunoinflamatória promovida pelo *M. tuberculosis* e pela PBM, além de psicológica, pelo estresse de restrição, decorrente da imobilização parcial durante a fase de instalação dos sintomas clínicos, tais como paresia ou paralisia, que acometem os animais.

Já é bem estabelecido na literatura que o estresse de restrição repetitivo, 3h/d, por três dias consecutivos, suprime a ingesta de alimentos e o peso corporal (HARRIS *et al.*, 1999). A diminuição de peso ocorre imediatamente após o estresse e mantém-se por um longo período, mesmo após 40 dias do término do estresse (HARRIS *et al.*, 1999). Por outro lado, a redução da ingesta ocorre uma semana antes do término do estresse e sem hiperfagia compensatória, resposta normalmente observada em animais privados de comida. O mecanismo exato não é bem elucidado, mas parece envolver o hormônio liberador da corticotrofina (CRH), neuropeptídeo Y e serotonina (GRIGNASCHI, MANTELLI, SAMANIN, 1993; HEINRICHS *et al.*, 1992; SHIMIZU & BRAY, 1989). Entretanto, esses retornam a níveis basais 2 h após o término das 3 h de estresse de restrição (RYBKIN *et al.*, 1999). Portanto, mudanças nesses sistemas podem sucessivamente explicar a hipofagia que imediatamente se segue ao estresse de restrição, mas falha em explicar a hipofagia prolongada e a ausência de hiperfagia compensatória durante o período

pós-estresse. Isso pode ser explicado por mudanças no metabolismo periférico, pós-estresse, como aumento da sensibilidade à insulina e inibição da entrada da glicose nos adipócitos, além de uma elevada oxidação sem esterificação de ácidos graxos, indicando uma mudança no suplemento de energia de glicose a ácidos graxos (ZHOU *et al.*, 1999).

Essa queda de peso foi verificada em todos os animais que receberam a PBM com o adjuvante de Freund, contendo o *M.tuberculosis*, ou seja, tanto naqueles que receberam salina icv, quanto naqueles que receberam a SP ou o seu antagonista, a perda de peso foi estatisticamente significativa, quando da instalação dos sinais clínicos, e discreta no dia subsequente à imunização, concluindo-se que esse tipo de estresse não pôde ser bloqueado pela SP ou que as mudanças metabólicas envolvidas nesse tipo de alteração não são inerentes às vias metabólicas às quais a SP modula.

5.4. IMUNIDADE CELULAR

O fato de que algumas substâncias podem aumentar, tanto quanto diminuir, funções celulares imunoinflamatórias deve-se a uma dualidade que poderia ser parcialmente explicada por dose-dependência e/ou em decorrência de uma variedade de sistemas ou de populações celulares heterogêneas serem recrutadas. Por exemplo, tem sido repetitivamente mostrado que proliferação celular, síntese de Igs e atividade NK, poderiam ser aumentadas, inibidas ou não afetadas por neuropeptídeos como somatostatina ou peptídeo vasoativo intestinal. A SP que, em geral, estimula a atividade linfocítica, pode, sob certas condições, inibi-la (AGRO & STANISZ *et al.*, 1995).

Durante uma resposta imune, neutrófilos e linfócitos migram para dentro de tecidos não linfóides. A resposta inflamatória aguda é caracterizada por um influxo precoce de neutrófilos, com linfócitos e fagócitos polimorfonucleares invadindo a lesão um dia após, tornando-se os tipos celulares predominantes nos sítios inflamatórios crônicos, tal qual ocorre nas placas de Esclerose Múltipla no SNC (MALE *et al.*, 1991).

A cascata de citocinas induzida pelos processos inflamatórios pode regular o acúmulo de células NK em vários tecidos e é possível que estas reconheçam as células T

encefalitogênicas ativadas nos órgãos linfóides alvos, modulando a sua função (MATSUMOTO *et al.*, 1998; WHITESIDE *et al.*, 1998). Citocinas produzidas pelos linfócitos T e células acessórias exercem ambos os efeitos, estimulatórios e inibitórios, sobre a resposta imune. Esses efeitos não têm, geralmente, especificidade antigênica. Dentre as citocinas implicadas nesta modulação, a IL-1, juntamente com o CRH, inibem a atividade NK por mediação simpática (IRWIN *et al.*, 1987; IRWIN *et al.*, 1988; IRWIN *et al.*, 1990; SAPERSTEIN *et al.*, 1992); a IL-10 aumenta a proliferação das células NK, assim como a sua atividade citotóxica, dependente de uma produção elevada de IFN- γ pelas mesmas (CAI *et al.*, 1999).

Um possível papel supressivo para células NK em EAE tem sido sugerido por vários estudos (ZHANG *et al.*, 1997; MATSUMOTO *et al.*, 1998; SMELTZ, WOLF, SWANBORG *et al.*, 1999), onde essas células seriam implicadas na diferenciação das células T imaturas, além de secretarem IFN- γ , o qual promoveria a transformação das células T em células Th1. Além disso, elas influenciariam a função das células B na secreção de anticorpos (TAKEDA & DENNERT, 1993), função macrofágica e diferenciação Th2 (HOSHINO *et al.*, 1999).

Alguns trabalhos sugeriram também que o comprometimento das células NK exacerba a doença, pois ela pode ser agravada pela deleção dessas células com o tratamento com anticorpo anti-NK (ZHANG *et al.*, 1997), o que explicaria a baixa atividade NK, vista nos ratos-controle EAE no pico do estágio clínico da doença (Figura 7). Além disso, a administração de drogas imunomoduladoras, que aumentam a atividade NK, suprime sinais clínicos e histológicos da EAE crônica, reforçando a hipótese de que essas células tenham uma função regulatória na EAE (KARUSSIS *et al.*, 1993). Paralelamente, um grande número dessas células foi encontrado no SNC, principalmente no pico do estágio da EAE (MATSUMOTO *et al.*, 1998), enfatizando seu papel na evolução da doença. Os achados deste estudo, no que tange ao aumento percentual dessas células no baço nos ratos-controle EAE (figura 10), poderia sugerir a hipótese de que as mesmas seriam recrutadas para o SNC pela corrente sangüínea a fim de participarem nos processos de recuperação da doença.

Analogamente, pacientes com EM têm células NK reduzidas no sangue periférico comparadas aos normais (MUNSCHAUER *et al.*, 1995), enfatizando a reprodutibilidade fisiopatológica do modelo experimental em humanos e validando, ainda mais, os dados deste estudo.

Por outro lado, o papel da SP em modular esta atividade não está bem claro, pois a injeção da SP não alterou o percentual de atividade NK esplênica, e a reversão desta pelo antagonista, verificada no grupo EAEAnSP, não foi evidenciada no grupo EAEAnS, sugerindo que a resposta ao antagonista tenha sido prejudicada pelo efeito alostérico da SP ou que a SP não tenha um papel modulador direto neste tipo celular, mas possa atuar, através do sistema simpático, para a produção local dentro do baço de ACTH pelos linfócitos. Esse aumento da produção local de ACTH pode elevar a atividade NK (MCGLONE, LUMPKIN, NORMAN, 1991), explicando as taxas elevadas dessa atividade no grupo EAEAnSP. Por outro lado, as alterações que se verificam entre os grupos doentes injetados com SP ou veículo em relação aos correspondentes simulados devem-se, provavelmente, aos mecanismos imunoinflamatórios intrínsecos da doença, como, por exemplo, a produção de ILs ou de CRH, pois o aumento deste, pela ativação do simpático, com o aumento do conteúdo da norepinefrina esplênica, poderia explicar a queda tão acentuada da atividade NK nos grupos simulados (IRWIN *et al.*, 1988; IRWIN *et al.*, 1990).

O discreto aumento da atividade NK observado nos ratos EAE tratados com salina (figura 10) foi provavelmente causado por estresse, já que estudos com injeções intraperitoneais diárias de salina hipertônica resultaram em um aumento sustentado no RNAm do CRF, similar àquele visto com o estresse de imobilização (HARBUSZ *et al.*, 1995).

Quanto ao fenótipo NK, determinado por citometria de fluxo, evidenciou-se uma tendência elevada ao recrutamento das células NK esplênicas no grupo EAE controle, comparado aos ratos normais (figura 4), em detrimento de uma atividade diminuída dessas células. O aumento de outras populações celulares, como os linfócitos CD3⁺ e CD4⁺, no grupo EAE controle, refletiu principalmente um melhor recrutamento de células CD4⁺ pelo baço na doença. Esse recrutamento também foi verificado em ratos tratados com SP, quando comparados aos tratados com veículo, indicando um papel modulatório da SP no

recrutamento dessas células no baço (figura 8), já que é descrita a sua ação estimulante sobre a proliferação de linfócitos T e a síntese de anticorpos (STANISZ, BEFUS, BIENENSTOCK, 1986). A SP pode modular respostas inflamatórias também por controlar a patência da resistência dos vasos, agindo diretamente em células de mastócitos para causar a liberação de grânulos (BROWN *et al.*, 1982). Nossa hipótese é a de que ela possa também ter a mesma função a nível do SNC, agindo na permeabilidade dos capilares centrais e selecionando os tipos celulares que vão permear os subtipos inflamatórios.

Uma outra população timo-dependente também implicada na auto-imunidade é a célula NKT, que também foi investigada neste estudo. O antagonista da SP induziu um fluxo migratório de células NKT para fora do baço, sugerindo que a SP possa influenciar este tráfego celular, também via sistema simpático (Figura 11).

Em suma, os resultados deste estudo sugerem que houve um comprometimento de células NK no curso da EAE, em decorrência da diminuição dessas células no pico do estágio da doença. A SP, como peptídeo neuromodulador, poderia estar interferindo no fluxo migratório de células NK, T e NKT a nível do baço, controlando, através do sistema simpático, ou produção local de ACTH, o recrutamento destas no processo inflamatório ou mesmo incrementando os mecanismos de regulação e auto-limitação desse processo patológico.

Portanto, este projeto de pesquisa permitiu avaliar os diferentes aspectos imunológicos da EAE e da modulação da SP nesse modelo imunoinflamatório de doença, assim como mecanismos fisiopatológicos implicados na sua gênese e evolução. Os resultados nele coletados permitiram mostrar que a resposta imune na EAE é claramente influenciada pelos sistemas nervoso e endócrino, através da liberação de hormônios que podem afetar a produção de ou a resposta a citocinas. Especificamente, esses achados também suportam a hipótese de que a SP possa modular os mecanismos de controle da EAE e prover questionamentos para várias interpelações a respeito da fisiopatologia e tratamento da esclerose múltipla.

Estima-se que este trabalho possa acrescentar novas idéias que permitam ampliar os estudos para o entendimento dos eventos imunopatológicos nesta doença, sugerindo novas estratégias de pesquisas futuras.

6. CONCLUSÕES

No modelo de EAE, a ativação do eixo HHA levou ao aumento da produção de ACTH e corticosterona no pico dos sinais clínicos, sem aumento do AVP, indicando, provavelmente, que a via de estimulação deste processo patológico possa ser o CRH e não o AVP, como ocorre na artrite adjuvante.

Os resultados de ACTH e corticosterona obtidos em ratos tratados com SP mostraram uma queda nos seus valores plasmáticos que não foi revertida quando os animais foram tratados previamente com o antagonista da SP, indicando uma possível ausência ou quantidade não expressiva de SP endógena no pico dos sinais clínicos da EAE.

Do mesmo modo, variações observadas nas subpopulações celulares do baço, com aumento do recrutamento das células NK esplênicas e uma conseqüente diminuição da sua atividade nos animais doentes, evocam o papel modulador deste tipo celular na EAE. E mais, modificações no tráfego de linhagens celulares como células CD4⁺ e NKT pela injeção de SP e, desta última, com acentuada redução após a injeção do antagonista, induz ao raciocínio de que esse neuropeptídeo possa ser um elemento modulador importante nos processos fisiopatológicos dessa doença.

Em conjunto, os dados obtidos neste trabalho sugerem que a SP possa influenciar tanto o eixo HHA como a resposta imune celular esplênica na EAE, embora não diretamente, mas provavelmente através de alças regulatórias, deixa antever a possibilidade de se estruturarem novos projetos que permitirão estudar a importância desta substância na etiopatogenia desta doença.

7.SUMMARY

Substance P centrally injected (ICV) in rats acts on the autonomic nervous system and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) to modulate innate immune function and inflammatory response in autoimmune diseases. The effects of modulation in migration and in natural killer cell activity of splenocytes in these systems were studied in experimental allergic encephalomyelitis (EAE) a model of autoimmune disease which acts as a chronic inflammatory stress. The migration characteristics observed by flow cytometry were of the CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD3⁺NKR-P1⁺ and NKT splenocyte subpopulations. The innate immune function measured was that of the cytotoxic NK activity measured by Cr⁵¹ liberation assay in the peak of the inflammatory process. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis alterations were measured by quantifying the plasma hormone levels of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and corticosterone and the median eminence values of arginine vasopressin. In this chronic inflammatory model was observed an increased retention in the spleen of CD3⁺ (64,2 ± 0,8 %), CD4⁺ (59,6 ± 0,6 %), CD8⁺ (14,5 ± 0,5 %) and CD3⁺NKR-P1⁺ (8,8 ± 0,3 %) cellular subtypes with a diminished NK cytotoxic activity (5,2 ± 0,6 %) when compared to healthy control rats [CD3⁺ (47,8 ± 2,2 %), CD4⁺ (45,6 ± 1,3 %), CD8⁺ (10,7 ± 0,4 %), CD3⁺NKR-P1⁺ (4,9 ± 0,4 %), NK cytotoxic activity (8,9 ± 0,7 %), ACTH (10,2 ± 1,4 pg/ml), corticosterone (2,2 ± 0 ng/ml)]. There was an inverse correlation with high levels of ACTH (92,2 ± 38,5 pg/ml) and corticosterone (152,1 ± 42,5 ng/ml). Substance P 20 nanomols ICV injected also increased the retention of CD4⁺ (51,3 ± 1,7 %), CD8⁺ (15,0 ± 0,8 %) and CD3⁺NKR-P1⁺ (10,4 ± 0,9 %) in the spleen of EAE rats with a lower NK cytotoxic activity (5,4 ± 0,6 %) in the peak of the clinical symptoms and decreased levels of ACTH (21,3 ± 2,3 pg/ml) and corticosterone (44,1 ± 16,2 ng/ml) when compared to injected saline controls [CD4⁺ (41,2 ± 4 %), CD8⁺ (11,8 ± 1,5 %) and CD3⁺NKR-P1⁺ (6,5 ± 1,7 %) NK cytotoxic activity (7,6 ± 0,2 %), ACTH (47,1 ± 6 pg/ml), corticosterone (120,3 ± 17,8 ng/ml)]. When treated with a substance P antagonist NKT cells presented a decreased splenic retention [antagonist + saline (0,5 ± 0,04 %) e antagonist + SP (0,6 ± 0,1 %)] when compared to saline-treated group (1,3 ± 0,1 %), suggesting a role for substance P in the migration control of this type of cell.

We can conclude that the results of this work suggest a role for substance P in the modulation of the HPA axis, to the lymphocyte traffic control and to the innate immune response in chronic autoimmune inflammatory diseases.

8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADER, R.; FELTEN, D.L.; COHEN, N. **Psychoneuroimmunology**. New York, Academic Press, New York, 1991.
- AGRO, A.; STANISZ, A.M. -Neuroimmunomodulation: classical and non-classical cellular activation. **Advanced Neuroimmunology**, **5**: 311-319, 1995.
- ALLEN, I.V. -The pathology of multiple sclerosis: fact, fiction and hypothesis. **Neurophatology Appl. Neurobiology**, **7**: 169-182, 1981.
- ANDERSON, P.B. & GOODKIN D.E. -Glucocorticosteroid therapy for multiple sclerosis: a critical review. **Journal Neurology of Science**, **160**: 16-25, 1998.
- BANTLOW, C.E.; MEYER, M.; LINDHOLM, D.; SPRANGER, M.; HEUMANN, R.; THOENEN, H. -Regional and cellular codistribution of interleukin 1 β and nerve growth factor mRNA in the adult rat brain: possible relationship to the regulation of nerve growth factor synthesis. **Journal of Cell Biology**, **111**: 1701-1711, 1990.
- BARKER R. & LARNER. -Substance P and multiple sclerosis. **Medicine Hypotheses**, **37**: 40-43, 1992.
- BENVENISTE, E.N. -Inflammatory cytokines within the central nervous system: sources, function and mechanisms of action. **Cellular Physiology**, **32**: 1-16, 1992.
- BERKENBOSH, F.; VAN OERS, J.; DEL REY, A.; TILDERS, F.; BESEDOVSKY, H. - Corticotropin-releasing factor producing neurons in the rat activated by interleukin-1. **Science**, **238**: 524-526, 1987.
- BERNTON, E.W.; BEACH, J.P.; HOLADAY, J.W.; SMALLRIDGE, R.C.; FEIN, H.G. - Release of multiple hormones by a direct action of interleukin-1 on pituitary cells. **Science**, **238**: 519-521, 1987.
- BESEDOVSKY, H.O.; DEL REY, A.E.; SORKIN, E. -What do the immune system and the brain know about each other? **Immunology Today**, **4**: 342-346, 1983.

- BESEDOVSKY, H. -Corticotropin-releasing factor producing neurons in the rat activated by interleukin-1. *Science*, **238**: 524-526, 1987.
- BIZIÈRE, K.; GUILLAUMIN, J.M.; DEGENNE, D.; BARDO, P.; RENOUX, M.; RENOUX G. in: *Neural Modulation of Immunity*, New York, eds. GUILLEMIN, R; COHN, M. AND MELNECHUK, T., RAVEN, New York, 1985, p. 81-94.
- BOLTON, C.; O' NEYILL, J.K.; ALLEN, S.J.; BAKER, D. -Regulation of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis by endogenous and exogenous glucocorticoids. *Int. Arch. Allerg. Immunology*, **114**: 74-80, 1997.
- BREDER, C.D.; DINARELLO, C.A.; SAPER, C.B. -Interleukin-1 immunoreactive innervation of the human hypothalamus. *Science*, **240**: 321-324, 1988.
- BROWN, M.R.; FISHER, L.A.; SPIESS, J.; RIVIER, C.; RIVIER, J.; VALE, W. - Corticotropin-releasing factor: actions in the sympathetic nervous system and metabolism. *Endocrinology*, **111**: 928-931, 1982.
- BUCKINGHAM, J.C.; COWELL, A.M.; GILLIES, G.E.; HERBISON A.E.; STELL J.H. - The neuroendocrine system: anatomy, physiology and responses to stress. In: *Stress, Stress Hormones and the Immune System*, eds. J.C. BUCKINGHAM, A.M COWELL, GILLIES. John Wiley and Sons, Chichester. 1997, p.9-47.
- CAI, G.; KASTELEIN, R.A.; HUNTER, C.A. -IL-10 enhances NK cell proliferation, cytotoxicity and production of IFN- γ when combined with IL-18. *European Journal Immunology*, **29**: 2658-2665, 1999.
- CHOWDREY, H.S.; JESSOP, D.S.; LIGHTMAN, S.L. -Substance P stimulates arginine vasopressin and inhibits adrenocorticotropin release in vivo in the rat. *Neuroendocrinology*, **52**: 90-93, 1990.
- CHOWDREY, H.S.; LARSEN, P.J.; HARBUZ, M.S.; LIGHTMAN, S.L.; JESSOP, D.S. - Endogenous substance P inhibits the expression of corticotropin-releasing hormone during a chronic inflammatory stress. *Life Science*, **22**: 2021-2029, 1995.

- CHOWDREY H.S.; LIGHTMAN S.L.; HARBUZ, M.S.; LARSEN P.J.; JESSOP D.S. - Contents of corticotropin-releasing hormone and arginine vasopressin immunoreactivity in the spleen and thymus during a chronic inflammatory stress. **Journal of Neuroimmunology**, 53(1):17-21, 1994.
- CRAGGS, R.I. & WEBSTER, H.F. -Ia antigens in the normal rat nervous and in lesions of experimental allergic encephalomyelitis. **Acta Neuropathology**, 68: 263-272, 1985.
- CROSS, R.J.; BROOKS, W.H.; ROSZMAN T.L. -Hypothalamic-immune interactions: effect of hypophysectomy on neuroimmunomodulation. **Journal of Neurological Science**, 53: 557-566, 1982.
- CROSS, A. H.; CANELLA, B.; BROSNAN, C.F.; RAINE, C.S. -Homing to central nervous system vasculature by antigen-specific lymphocytes 1. Localisation of 14 C-labeled cells during acute, chronic, and relapsing experimental allergic encephalomyelitis. **Laboratory Investigation**, 63: 162-170, 1990.
- CROSS, R. J.; MARKESBERY, W.R.; BROOKS, W.H.; OSZMAN, T.L. -Hypothalamic-immune interactions: neuromodulation of natural activity by lesioning of the anterior hypothalamus. **Immunology**, 1: 399-405, 1984.
- CRUSE J.; KEITH J.; BRYANT L.; LEWIS R. -Immune system-neuroendocrine dysregulation in spinal cord injury. **Immunology Research**, 15: 306-314, 1996.
- CULMAN J.; ITOI K.; UNGER T. -Hypothalamic Tachykinins-Mediators of stress responses? **Annals New York Academy of Sciences**, New York, 1995; p.204-218.
- DAVISON, A.N. -The relevance of experimental allergic encephalomyelitis to multiple sclerosis. **Journal Royal Society Medicine**, 85: 425-426, 1992.
- DEIBLER, G.E.; MARTENSON, R.E.; KIES, M.W. -Large scale preparation of myelin basic protein from central nervous tissue of several mammalian species. **Prep. Biochemistry**, 2: 139-165, 1972.

- DELISSER, H.M.; NEWMAN, P.J.; ALBEDA, S.M. -Molecular and functional aspects of PECAM-1/CD31. **Immunology Today**, **15**: 490-495, 1994.
- FELTEN, D.L.; FELTEN, S.Y.; BELLINGER, D.L.; LORTON, D. -Noradrenergic and peptidergic innervation of secondary lymphoid organs: role in experimental rheumatoid arthritis. **European Journal Clinical Investigation**, **22** (suppl.1): 37-41, 1992.
- FONTANA, A.; KRISTENSEN, F.; DUBS, R.; GEMSA, D.; WEBER, E. -Production of prostaglandin E and interleukin-1-like factor by cultured astrocytes and C 4 glioma cells. **Journal of Immunology**, **129**, 2413-2419, 1982.
- FONTANA, A.; FIERZ, W., WEKERLE, H. -Astrocytes present myelin basic protein to encephalitogenic T-cell lines. **Nature**, **307**, 273-276, 1984.
- FORNI, G.; BINDONI, M.; SANTONI, A.; BELLUARDO, N.; MARCHESE, A.E. & GIOVARELLI, M. - Radiofrequency destruction of the tuberoinfundibular region of hypothalamus permanently abrogates NK cell Activity in mice. **Nature** **306**, 181-184, 1983.
- FREUND, J. -The model of the action of immunologic adjuvants. **Adv. Tuberc. Research**, **7**, 130-148, 1956.
- GIULIAN, D. -Ameboid microglia as effectors of inflammation in the central nervous system. **Journal Neuroscience Research**, **18**, 155-171, 1987.
- GRIGNASCHI, M.; MANTELLI, B.; SAMANIN, R. - Hypophagic effect of restraint stress in rats can be mediated by 5-HT₂ receptors in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. **Neuroscience Letters**, **152**: 103-106, 1993.
- GOLDMUNTZ, E.A.; BROSNAN, C.F., NORTON, W.T. -Prasosin treatment suppress increased vascular permeability in both acute and passively transferred experimental autoimmune encephalomyelitis in the Lewis rat. **Journal of Immunology**, **137**, 3444-3450, 1986.

- GOVERMAN, J. -Tolerance and autoimmunity in TCR transgenic mice specific for myelin basic protein. **Immunology Reviews**, **169**, 146-159, 1999.
- HAMMOND, K.J.L.; PELIKAN, S.B.; CROWE, N.Y.; BARRET, E.R.; NAKAYAMA, T.; TANIGUCHI, M.; SMYTH, M.J.; DRIEL, I.R.; SCOLLAY, R.; BAXTER, A.G.; GODFREY, D.Y. -NKT cells are phenotypically and functionally diverse. **European Journal Immunology**, **29**: 3768-3781, 1999.
- HAOUR, F.; BAN, E; MILON, G.; BARAN, D.; FILLION, G. -Brain Interleukin-1 receptors: characterization and modulation after lipopolysaccharide injection. **Progress in Neuroendocrinimmunology**, **3**: 196-204, 1990.
- HARBUZ, M.S.; CHOVER-GONZALEZ, A.J.; CONDE, G.L.; RENSHAW, D.; LIGHTMAN, S.L.; JESSOP, D.S. -Interleukin-1 beta-induced effects on plasma oxytocin and arginine vasopressin: role of adrenal steroids and route of administration. **Neuroimmunomodulation**, **3(6)**: 358-363, 1996.
- HARBUZ, M.S.; JESSOP, D.S.; CHOWDREY, H.S.; BLACKWELL, J.M.; LARSEN, P.J.; LIGHTMAN, S.L. -Evidence for altered control of hypothalamic CRF in immune-mediated diseases. **Annals New York Academic Science**, **771**: 449-458, 1995.
- HARTUNG, H.P.; ARCHELOS, J.J.; ZIELASEK, J.; GOLD, R.; KOLTZENBURG, M.; REINERS, K.H.; TOKYA, K.V. -Circulating adhesion molecules and inflammatory mediators in demyelination: a review. **Neurology**, **45 (suppl.6)**: S22-45, 1995.
- HEINRICHS, S.C.; COLE, B.J.; PICH, E.M.; MENZAGHI, F.; KOOB, G.F.; HAUGER, R.L. - Endogenous corticotropin-releasing factor modulates feeding induced by neuropeptide Y or a tailpinch stressor. **Peptides**, **13**: 879-884, 1992.
- HICKEY, W.S.; HSU, B.L.; KIMURA, H. -T-lymphocyte entry into the central nervous system. **Journal of Neuroscience Research**, **28**: 254-260, 1991.

- HIRAKAWA, K.; NARUSE, S.; HORIKAWA, Y.; TANAKA, C.; NISHIKAWA, H. -In: K.G. GO and A. BAETHMANN, ed. **Recent Progress in the study and Therapy of Brain Edema**, New York, Plenum Press, 1984, p.271.
- HIRANO, A.; KAWANAMI, T.; LLENA, J.F. -Electron microscopy of the blood-brain barrier in disease. **Microscopy Research Technique**, 27: 543-556, 1994.
- HOSHINO, T.; WINKLER-PICKETT, R.T.; MASON, A.T.; ORTALDO, J.R.; YOUNG, H.A. -IL-13 production by NK cells: IL-13 producing NK and T cells are present in vivo in the absence of IFN- γ . **Journal of Immunology**, 162: 51, 1999.
- IRWIN, M.; HAUGER, R.L.; BROWN, M.; BRITON, K.T. -CRF activates autonomic nervous system and reduces natural killer cytotoxicity. **American Journal Physiology**, 255: R744-747, 1988.
- IRWIN, M.; HAUGER, R.L.; JONES, L.; PROVENCIO, M.; BRITON, K.T. -Sympathetic nervous system mediates central corticotropin-releasing factor induced suppression of natural killer cytotoxicity. **Journal Pharmacology Experimental Therapy**, 255: 101-107, 1990.
- IRWIN, M.; VALE, W.; BRITTON, K.T. -Central corticotropin-releasing factor suppresses natural cell killer cytotoxicity. **Brain, Behavior and Immunity**, 1: 81-87, 1987.
- ISAKOVIC, K. & JANCOVIC, B.D. -Neuroendocrine correlates of immune response. II: changes in the lymphatic organs of brain-lesioned rats. **Internal Archives of Allergy**, 45: 373-384, 1973.
- JELLINGER, K. -Comparative studies on spinal cord microvasculature. -In: CERVOS-NAVARRO J., ed., **Pathway of cerebral microcirculation**, Amsterdam, de Gruyter, 1974, p. 45-58.
- JESSOP D.S.; CHOWDREY H.S.; LARSEN P.J.; LIGHTMAN S.L. -Substance P: multifunctional peptide in the hypothalamo-pituitary system? **Journal of Endocrinology**, 132: 331-337, 1992.

- JESSOP, D.S.; RENSHAW, D.; LIGHTMAN, S.L.; HARBUZ, M.S.- Changes in ACTH and beta-endorphin immunoreactivity in immune tissues during a chronic inflammatory stress are not correlated with changes in corticotropin-releasing hormone and arginine vasopresin. **Journal of Neuroimmunology**, **60**(1-2): 29-35, 1995.
- JONES, R.E.; BOURDETTE, D.N.; OFFNER, H.; VANDENBARK, A.A. - Myelin basic protein-specific Tcells induced demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis in Buffalo rats. **Journal of Neuroimmunology**, **30**: 61-69, 1990.
- JUHLER, M. -Pathophysiological aspects of acute experimental allergic encephalomyelitis. **Acta Neurologica Scandinavica**, **78** (SUPPL. 119): 3-21, 1988.
- JUHLER, M.; BARRY, D.I.; OFFNER, H.; KONAT, G.; KLINKEN, L.; PAULSON, O.B. -Blood-brain and blood-spinal cord barrier permeability during the course of experimental allergic encephalomyelitis in the rat. **Brain Research**, **302**: 347-355, 1984.
- JUHLER, M.; BLASBERG, R.G.; FENSTERMACHER, J.D.; PATLAK, C.S.; PAULSON, O.B. -A spatial analysis of the blood-brain barrier damage in experimental allergic encephalomyelitis. **Journal Cerebral Blood Flow Metabolism**, **5**: 545-553, 1985.
- KARIN, N.; SZAFER, F.; MITCHELL, D.; GOLD, D.P.; STEINMAN, L. -Selective and nonselective stages in homing of T lymphocytes to the central nervous system during experimental allergic encephalomyelitis. **Journal of Immunology**, **150**: 4116-4124, 1993.
- KARUSSIS, D.M.; LEHMANN, D.; SLAVIN, S.; VOURKA-KARUSSIS, U.; MIZRACHI-KOLL, R.; OVADIA, H.; KALLAND, T.; ABRAMSKY, O. -Treatment of chronic-relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis with the synthetic immunomodulator linomide (quinoline-3-carboxamide). **Proc. Natl. Acad. Science USA**, **90**: 6400-6404, 1993.

- KENT, S.; BLUTHÉ, R.M.; KELLEY, K.W.; DANTZER, R. -Sickness behavior as a new target for drug development. **Trends in Pharmacological Science**, 13: 24-28, 1992.
- KIES, M.W.; MURPHY, JB.; ALVORD, E.C. -Fractionation of guinea pig proteins with encephalitogenic activity. **Fed. Proc**, 19: 207, 1960.
- KINOCHI, K.; BROWN, G.; PASTERNAK, G.; DONNER, D.B. -Identification and characterization of receptors for tumor necrosis factor- α in the brain. **Biochemical, Biophysical Research Communications**, 181: 1532-1538, 1991.
- KOHLRAUSCH, B.; RÖHRICH, F.; JUNG, S.; ROLF, H.J.; MEYERMANN, R.; SCHLUESENER, H.J. -Preclinical meningitis in EAE. **Clinical Neuropathology**, 11: 173-174, 1992.
- KOSTYK S.K.; KOWALL N.W.; HAUSER S.L. -Substance P immunoreactive astrocytes are present in multiple sclerosis. **Brain Research**, 504 (2): 284-288, 1989.
- LAEMMLI, U.K. -Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227: 680, 1970.
- LAMBERT, P.L., HARRELL, E.H. ACHTERBERG, J. -Medial hypothalamic stimulation decreases the phagocytic activity of the reticuloendothelial system. **Physiological Psychology**, 9: 193-196, 1981.
- LANNES-VIEIRA, J.; GEHRMANN, J.; KREUTZBERG, G.W.; WEKERLE, H. -The inflammatory lesion of T cell line transferred experimental autoimmune encephalomyelitis of the Lewis rat: distinct nature of parenchymal and perivascular infiltrates. **Acta Neuropathology**, 87: 435-442, 1994.
- LARSEN P.J.; JESSOP D.; PATEL H.; LIGHTMAN, S.L.; CHOWDREY, H.S. - Substance P Inhibits the Release of Anterior Pituitary Adrenocortrophin Releasing Factor-Containing Neurons in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus. **Journal of Neuroendocrinology**, 5: 99-105, 1993.

- LASSMANN H.; BRUNNER, C.; BRADL, M.; LININGTON, C. -Experimental allergic encephalomyelitis: the balance between encephalitogenic T lymphocytes and demyelinating antibodies determines size and structure of demyelinated lesions. **Acta Neuropathology**, **75**: 566-576, 1988.
- LASSMANN, H.; ZIMPRICH, F.; ROSSLER, K.; VASS, K. -Inflammation in the nervous system. Basic mechanisms and immunological concepts. **Review Neurological**, **147**: 763-781, 1991.
- LEE, S.C.; MOORE, G.R.W.; GOLENWSKY, G.; RAINE, C.S. -Multiple sclerosis: a role for astroglia in active demyelination suggested by class II MHC expression and ultrastructural study. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, **49**: 122-136, 1990.
- LININGTON, C.; BRADL, M.; LASSMANN, H.; BRUNNER, C.; VASS, K. - Augmentation of demyelination in rat acute allergic encephalomyelitis by circulating mouse monoclonal antibodies directed against a myelin/oligodendrocyte glycoprotein. **American Journal of Pathology**, **130**: 443-454, 1988.
- LININGTON, C.; MORGAN, B.P.; SCOLDING, N.J.; WILKINS, P.; PIDDLESDEN, S.; COMPSTON, D.A.S. -The role of complement in the pathogenesis of experimental allergic encephalomyelitis. **Brain**, **112**: 895-911, 1989.
- LYON-CAEN, O. & CLANET, M. -**La Sclérose en plaques**, 1nd ed., Paris, John Libbey Eurotext, 1997.
- LYMAN, W.D.; ROTH, G.A.; BROSNAN, C.F.; BORNSTEIN, M.B.; RAINE, C.S. - Quantitation of antigen specific T-cell induced demyelination in vitro. **Journal of Neuroimmunology**, **17**: 175-180, 1988.
- LOSSINSKY, A.S.; PLUTA, R.; SONG, M.J.; BADMAGEY, V.; MORETZ, R.C.; WISNIEWSKY, H.M. -Mechanisms of inflammatory cell attachment in chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis: a scanning and high-voltage

- electron microscopic study of the injured mouse BBB. **Microvascular Research**, **41**: 299-310, 1991.
- MALE, D.; CHAMPION, B.; COOKE, A.; OWEN, M. **Advanced Immunology**, 2nd ed., London, Gower Medical Publishing, 1991.
- MANTOVANI, A. & DEJANA, E. -Cytokines as communication signals between leucocytes and endothelial cells. **Immunological Today**, **10**: 370-375, 1989.
- MARTIN F.C.; ANTON P.A.; GORNBEIN J.A.; SHANAHAN F.; MERRILL J.E. - Production of interleukin-1 by microglia in response to substance P: role for a non-classical NK-1 receptor. **Journal of Neuroimmunology**, **42** (1): 53-60, 1993.
- MARTIN F.C.; CHARLES A.C.; SANDERSON M.J.; MERRILL J.E. -Substance P stimulates IL-1 production by astrocytes via intracellular calcium. **Brain Research**, **599** (1): 13-18, 1992.
- MARTIN F.C.; MCFARLAND, H.F.; MCFARLIN D.E. -Immunological aspects of demyelinating diseases. **Annals Review Immunology**, **10**: 153-187, 1993.
- MATSUMOTO, Y.; KOHYAMA, K.; AIKAWA, Y.; SHIN, T.; KAWAZOE, Y.; SUZUKI, Y.; TANUMA N. -Role of natural killer cells and TCR $\gamma\delta$ T cells in acute autoimmune encephalomyelitis. **European Journal Immunology**, **28**: 1681-1688, 1998.
- MCCARRON, R.M.; KEMPSKY, O.; SPATZ, M.; MCFARLIN, D.E. -Presentation of myelin basic protein by murine cerebral vascular endothelial cells. **Journal of Immunology**, **134**: 3100-3103, 1985.
- MCCARRON, R.M.; RACKE, M.K.; SPATZ, M.; MCFARLIN, D.E. -Cerebral vascular endothelial cells are effective targets for in vitro lysis by encephalitogenic T lymphocytes. **Journal of Immunology**, **147**: 503-508, 1991.

- MCCARRON, R.M.; WANG L.; RACKE, M.K.; MCFARLIN, D.E.; SPATZ, M. - Cytokine-regulated adhesion between encephalitogenic T lymphocytes and cerebrovascular endothelial cells. *Journal of Neuroimmunology*, **43**: 23-30, 1993.
- MCDONALD, W.I. & BARNES, D. -Lessons from magnetic resonance imaging in Multiple Sclerosis. *TINS*, **12**: 376-379, 1989.
- MCDONALD, W.I.; MILLER, D.H.; BARNES, D. -The pathological evolution of multiple sclerosis. *Neurophatology Appl. Neurobiology*, **18**: 319-334, 1992.
- MC FARLIN, D.E.; BLANK, S.E.; KIBLER, R.F. -Recurrent experimental allergic encephalomyelitis in the Lewis rat. *Journal of Immunology*, **113**: 712-715, 1974.
- MCGLONE, J.J.; LUMPKIN, E.A.; NORMAN, R.L. -Adrenocorticotropin stimulates natural killer cell activity. *Endocrinology*, **129**(3): 1653-1658, 1991.
- MICHELSON, D.; STONE, L.; GALLIVEN, E.; MAGLAKOU, M.A.; CHROUSOS, G.P.; STERNBERG, E.M.; GOLD, P.W. -Multiple sclerosis is associated with alterations in hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. *Journal Clinical Endocrinology Metabolism*, **79**(3): 848-853, 1994.
- MUNSCHAUER, F.E.; HARTRICH, L.A., STEWART, C.C., JACOBS, L. -Circulating natural killer cells but not cytotoxic T lymphocytes are reduced in patients with active relapsing multiple sclerosis and little clinical disability as compared to controls. *Journal of Neuroimmunology*, **62**(2): 177-181, 1995.
- NAMER, I.J.; STEIBEL, J.; POULET, P.; ARMSPACH, J.P. -In Vivo Dynamic MR Imaging of MBP-Induced Acute Experimental Allergic Encephalomyelitis in Lewis Rat. *Magnetic Resonance in Medicine*, **24**: 325-334, 1992.
- OHMICHI, M.; HIROTA, K.; KOIKE, K.; KURACHI, H.; OHTSUKA, S.; MATSUZAKI, N.; YAMAGUSHI, M.; MIYAKE, A.; TANIZAWA, O. -Binding sites for interleukin-6 in the anterior pituitary gland. *Neuroendocrinology*, **55**: 199-203, 1992.

- OLSSON, T. -Cytokine-producing cells in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Neurology*, **45** (suppl.6): S11-S15, 1995.
- OLSSON, Y. -Topographical differences in the vascular permeability of the peripheral nervous system. *Acta Neuropathologica*, **10**: 26-33, 1968.
- OPDENAKKER, G. & VAN DAMME, J. -Cytokine-regulated proteases in autoimmune diseases. *Immunology Today*, **15**: 103-107, 1994.
- PAXINOS, G. & WATSON, C. -*The rat brain in stereotaxic coordinates*, 4th ed., New York, Academic Press, 1992.
- PENDER, M.P. -The pathophysiology of acute experimental allergic encephalomyelitis in the Lewis rat. *Journal of Neurological Science*, **84**: 209-222, 1988.
- PENDER, M.P. -The pathophysiology of myelin basic protein-induced acute experimental allergic encephalomyelitis in the Lewis rat. *Journal of Neurological Science*, **86**: 277-289, 1988.
- PENDER, M.P. & SEARS, T.A. -Involvement of the dorsal root ganglion in acute experimental allergic encephalomyelitis in the Lewis rat: a histological and electrophysiological study. *Journal Neurological Science*, **72**: 231-242, 1986.
- PENDER, M. P.; NGUYEN, K.B.; WILLENBORG, D.O. -Demyelination and early remyelination in experimental allergic encephalomyelitis passively transferred with myelin basic protein-sensitized lymphocytes in the Lewis rat. *Journal of Neuroimmunology*, **25**: 125-142, 1989.
- PETTERSSON, C.A.V. -Sheaths of the spinal nerve roots. Permeability and structural characteristics of dorsal and ventral spinal nerve roots of the rat. *Acta Neuropathologica*, **85**: 129-137, 1993.
- PIDDLESSEN, S.J.; LASSMANN, H.; ZIMPRICH, F.; MORGAN, B.P.; LININGTON, C. -The demyelinating potential of antibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein is

- related to their ability to fix complement. **American Journal of Pathology**, **143**, 555-564, 1993.
- PURBA, J.S.; RAADSHEER, F.C.; HOFMAN, M.A.; RAVID, R.; POLMAN, C.H.; KAMPHORST, W.; SWAAB, D.F. -Increased number of corticotropin-releasing hormone expressing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of patients with multiple sclerosis. **Neuroendocrinology**, **62**(1): 62-70, 1995.
- RAINE, C.S. -Biology of disease. Analysis of autoimmune demyelination: its impact upon multiple sclerosis. **Laboratory Investigation**, **50**: 608-634, 1984.
- RAINE, C.S.; CANNELLA, B.; DUIJVESTIJN, A.M.; CROSS, A.H. -Homing to central nervous system vasculature by antigen-specific lymphocytes. 2. Lymphocyte/endothelial cell adhesion during the initial stages of autoimmune demyelination. **Laboratory Investigation**, **63**: 476-489, 1990.
- RAINE, C.S. -Multiple Sclerosis: a pivotal role for the T cell in lesion development. **Neurophatology Appl. Neurobiology**, **17**: 265-274, 1991.
- RECHTHAND, E. & RAPOPORT, S.I. -Regulation of the microenvironment of peripheral nerve: role of the blood-nerve-barrier. **Prog. Neurobiology**, **28**: 303-343, 1987.
- REDER, A.T.; THAPAR, M.; JENSEN, M.A. -A reduction in serum glucocorticoids provokes experimental allergic encephalomyelitis: implications for treatment of inflammatory brain disease. **Neurology**, **44**: 2289-2294, 1994.
- RIVERS, T.M.; SPRUNT, D.H.; BERRY, G.P. -Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. **Journal Experimental Medicine**, **58**: 39-53, 1933.
- RIVEST, S.; TORRES, G.; RIVIER, C. -Differential effects of central and peripheral injection of interleukin 1- β on brain c-fos expression and neuroendocrine functions. **Brain Research**, **587**: 13-23, 1992.

- ROBERT, H.S. -Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Rodents as a Model for Human Demyelinating Disease. **Clinical Immunology and Immunopathology**, **77**: 4-13, 1995.
- RODRIGUEZ, M & SCHEITHAUER, BW. -Ultrastructure of Multiple Sclerosis. **Ultrastructural Pathology**, **18**: 3-13, 1994.
- RUMJANEK, V.M.; LEYTON, J.; MORLEY, J. -Mononuclear cell accumulation and plasma protein extravasation (PPE) during induction, remission and re-challenge of experimental allergic encephalomyelitis in the rat. **Journal of Neurological Science**, **65**: 81-92, 1984.
- SAPERSTEIN, A.; BRAND, H.; AUDHYA, T.; NABRISKI, D.; HUTCHINSON, R.; ROSENZWEIG, S.; HOLLANDER, C. -Interleukin-1 β mediates stress induced immunosuppression via corticotropin-releasing factor. **Endocrinology**, **130**: 152-158, 1992.
- SAPOLSKY, R.; RIVIER, C.; YAMAMOTO, G.; PLOTSKY, P.; VALE, W. -Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin-releasing factor. **Science**, **238**: 522-526, 1987.
- SAYETTA, R.B. -Theories of the etiology of multiple sclerosis: a critical review. **Journal of Clinical Laboratories Immunology**, **21**: 55-70, 1986.
- SCHÖHITZ, B.; VOORHUIS, D.A.M.; DE KLOET, E.R. -Localization of interleukin-6 mRNA and interleukin-6 receptor mRNA in rat brain. **Neuroscience Letters**, **136**: 189-192, 1992.
- SCHÖBITZ, B.; REUL, J.M.H.M.; HOLSBOER, F. -The role of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system during inflammatory conditions. **Critical Reviews in Neurobiology**, **8**: 263-291, 1994.
- SHANKS N.; HARBUZ M.S.; JESSOP D.S.; PERKS P.; MOORE P.M.; LIGHTMAN S.L. -Inflammatory disease as chronic stress. **Annals New York Academic Science**, **840**: 599-607, 1998.

- SHIMIZU, H. & BRAY, G.A. -Effects of neuropeptide Y on norepinephrine and serotonin metabolism in rat hypothalamus *in vivo*. **Brain Research Bulletin**, **22**: 945-950, 1989.
- SHOHAM, S.; DAVENNE, D.; CADY, A.B.; DINARELLO, C.A.; KRUEGER, J.M. - Recombinant tumor necrosis factor and interleukin-1 enhance slow-wave sleep in rabbits. **American Journal of Physiology**, **253**: R142-R149, 1987.
- SIMMONS, R.D.; BERNARD, C.C.A.; SINGER, G.; CARNEGIE, P.R. -Experimental autoimmune encephalomyelitis: an anatomically-based explanation of clinical progression in rodents. **Journal of Neuroimmunology**, **3**: 307-318, 1982.
- SMELTZ, R.B.; WOLF, N.A.; SWANBORG, R.H. -Inhibition of autoimmune T cell responses in the DA rat by bone marrow-derived NK cells *in vitro*: Implications for Autoimmunity. **Journal of Immunology**, **163**: 1390-1397, 1999.
- STANISZ, A.M.; BEFUS, D.; BIENENSTOCK, J. -Differential effects of vasoactive intestinal peptide, substance P, and somatostatin on immunoglobulin synthesis and proliferations by lymphocytes from Peyer's patches, mesenteric lymph nodes, and spleen. **The Journal of Immunology**, **136**: 152-156, 1986.
- SUNDAR, S.K.; CERPIAL, M.A.; KILTS, C.; RITCHIE, J.C.; WEISS, J.M. -Brain IL-1-induced immunosuppression occurs through activation of both pituitary-adrenal axis and sympathetic nervous system by corticotropin-releasing factor. **The Journal of Neuroscience**, **10**: 3701-3704, 1990.
- SUZUMURA, A.; MEZITIS, S.G.E.; GONATAS, N.K.; SILBERBERG, D.H. -MHC antigen expression on bulk isolated macrophage-microglia from newborn mouse brain: induction of Ia antigen expression by g-interferon. **Journal of Neuroimmunology** **15**: 163-178, 1987.
- TABIRA, T. -Autoimmune demyelination in the central nervous system. **Annals New York Academic Science**, **540**: 187-201, 1988.

- TALBOT, P. -Implication des virus dans la sclérose en plaques. *Médecine/Science*, **11**: 837-843, 1995.
- TAKEDA, K. & DENNERT, G. -The development of autoimmunity in C57BL/6 Ipr mice correlates with disappearance of natural Killer type1-positive cells: evidence for their suppressive action on bone marrow stem cell proliferation, B cell immunoglobulin secretion, and autoimmune symptoms. *Journal of Experimental Medicine*, **177**: 155, 1993.
- YARON, Y; NAPARSTEK, Y.; LEV-RAM, V.; HOLOSHITZ, J.; BEN-NUN, A.; COHEN, IR. -Immunospecific inhibition of nerve conduction by T lymphocytes reactive to basic protein of myelin. *Nature*, **303**: 246-247, 1983.
- VANDENBARK, A.A.; NILAVER, G.; KONAT, G.; TEAL, P.; OFFNER, H. -Chronic neurologic dysfunction and demyelination induced in Lewis rats by repeated injections of encephalitogenic T-lymphocyte lines. *Journal of Neuroscience Research*, **16**: 643-656, 1986.
- VASS, K. & LASSMANN, H. -Intrathecal application of interferon gamma: progressive appearance of MHC antigens within the rat nervous system. *American Journal of Pathology*, **137**: 789-800, 1990.
- WEKERLY, H.; LININGTON, C.; LASSMANN, H.; MEYERMANN, R. -Cellular immune reactivity within the CNS. *TINS*, **9**: 271-277, 1986.
- WEKERLY, H. -Molecular and cellular basis of autoimmune encephalitogenesis. In: *Multiple sclerosis research in Europe* ed. HOMMES OR. MTP Press, 1985, p:185-193.
- WHITESIDE, T.L.; VUJANOVIC, N.L.; HERBERMAN, R.B. -Natural Killer Cells and Tumor Therapy. *Currents Topics Microbiology Immunology*, **230**: 221-245, 1998.
- ZAMVIL, S.S. & STEINMAN, L. -The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Annals Review Immunology*, **8**: 579-621, 1990.

ZHANG, B.; YAMAMURA, T.; KONDO, T.; FUJIWARA M.; TABIRA T. -Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by Natural Killer (NK) cells. **Journal Experimental Medicine**, 186 (10): 1677-1687, 1997.

ZHOU, J.; YAN, X.; RYAN, D.H.; HARRIS, R.B.S. -Sustained effects of repeated restraint stress on muscle and adipocyte metabolism in high-fat-fed rats. **American Journal of Physiology**, 277: R757-R766, 1999.

ZHU, G.F.; CHANCELLOR-FREELAND, C.; BERMAN, A.S.; KAGE R.; LEEMAN; BELLER, DI.; BLACK, PH. -Endogenous Substance P Mediates Cold Water Stress-Induced Increase in Interleukin-6 Secretion from Peritoneal Macrophages. **The Journal of Neuroscience**, 16 (11): 3745-3752, 1996.

9. ANEXOS

Escala de escore histopatológico, segundo a classificação de Jones et al. (1990)

- 1) Focos de células inflamatórias somente na leptomeninge.
- 2) Um a quatro pequenos focos de células inflamatórias no parênquima.
- 3) Um a três grandes focos de células inflamatórias ou mais de quatro pequenos focos de células inflamatórias no parênquima.
- 4) Mais de três grandes focos de células inflamatórias no parênquima ou mais que a metade do parênquima difusamente infiltrado com células inflamatórias .

Média dos pesos dos vários grupos de ratos, com seus respectivos desvios-padrão e erros-padrão da média.

Estatísticas descritivas da variável peso do grupo normal

Dia	N	Média	D.P.	Erro Padrão
1	5	168.8	8.4380	3.7736
2	5	181.2	2.5884	1.1576
3	5	189.0	3.0000	1.3416
4	5	192.8	10.9179	4.8826
5	5	196.4	11.5239	5.1536
6	5	202.0	11.4018	5.0990
7	5	214.4	12.0333	5.3815

Estatísticas descritivas da variável peso do grupo EAEC

Dia	N	Média	D.P.	Erro Padrão
1	6	154.000	4.0000	1.6330
2	6	151.333	3.7238	1.5202
3	6	158.500	3.0822	1.2583
4	6	165.500	3.0822	1.2583
5	6	174.333	4.0825	1.6667
6	6	173.333	5.8878	2.4037
7	6	177.333	6.7725	2.7649
8	6	186.667	6.6533	2.7162
9	6	191.833	6.2743	2.5615
10	6	196.667	7.3394	2.9963
11	6	196.667	9.3524	3.8181
12	6	188.333	13.4114	5.4752
13	6	180.000	13.6235	5.5618
14	6	174.667	12.5645	5.1294
15	6	167.333	9.7707	3.9889

Estadísticas descriptivas da variável peso do grupo EAES

Dia	N	Média	D.P.	Erro Padrão
1	6	182.667	22.2231	9.0725
2	6	181.667	17.3167	7.0695
3	6	187.667	15.7184	6.4170
4	6	191.333	16.6213	6.7856
5	6	190.333	14.8279	6.0535
6	6	191.333	12.1106	4.9441
7	6	194.000	8.9443	3.6515
8	6	198.000	9.1214	3.7238
9	6	199.000	13.0690	5.3354
10	6	199.333	13.4858	5.5056
11	6	196.000	14.9131	6.0882
12	6	187.333	11.9778	4.8899
13	5	184.400	13.4462	6.0133
14	2	186.000	2.8284	2.0000

Estatísticas descritivas da variável peso do grupo EAESP

Dia	N	Média	D.P.	Erro Padrão
1	9	180.667	19.1050	6.3683
2	9	176.222	17.3045	5.7682
3	9	181.333	16.9706	5.6569
4	9	184.889	16.5563	5.5188
5	9	186.444	16.7862	5.5954
6	9	188.222	16.7465	5.5822
7	9	192.667	15.7162	5.2387
8	9	194.444	14.2400	4.7467
9	9	197.111	15.3984	5.1328
10	9	199.333	12.2474	4.0825
11	9	197.333	12.2882	4.0961
12	9	190.889	10.6354	3.5451
13	9	184.889	10.7755	3.5918
14	9	180.667	8.9443	2.9814
15	3	172.667	9.8658	5.6960
16	3	172.000	10.5830	6.1101
17	1	156.000	.	.

Estatísticas descritivas da variável peso do grupo EAEnS

Dia	N	Média	D.P.	Erro Padrão
1	6	163.667	8.6178	3.5182
2	6	161.000	10.0200	4.0906
3	6	166.000	11.3137	4.6188
4	6	169.000	8.6487	3.5308
5	6	172.667	7.2296	2.9515
6	6	175.000	8.0747	3.2965
7	6	177.667	7.4207	3.0295
8	6	179.333	7.0048	2.8597
9	6	184.000	8.6718	3.5402
10	6	188.333	7.6333	3.1163
11	6	185.333	8.7331	3.5653
12	6	177.667	9.9130	4.0470
13	6	169.000	9.1869	3.7505
14	4	166.500	11.9304	5.9652
15	2	161.000	1.4142	1.0000

Estatísticas descritivas da variável peso do grupo EAEAnSP

Dia	N	Média	D.P.	Erro Padrão
1	6	162.667	7.7632	3.1693
2	6	162.000	9.1214	3.7238
3	6	167.333	8.9144	3.6393
4	6	171.000	8.7407	3.5684
5	6	172.333	10.4626	4.2713
6	6	174.000	11.1714	4.5607
7	6	175.667	12.0941	4.9374
8	6	178.333	13.3517	5.4508
9	6	182.000	13.2061	5.3914
10	6	186.000	14.4776	5.9105
11	6	181.667	12.9254	5.2768
12	6	175.000	12.9460	5.2852
13	6	166.667	12.2420	4.9978
14	3	158.667	10.0664	5.8118
15	2	158.000	11.3137	8.0000