

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE

Rubens Murilo Gibaile Soares

**AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DA NEURITE ÓPTICA EM MODELO
ANIMAL DE ENCEFALOMIELITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL
INDUZIDO POR DUAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE
GLICOPROTEÍNA DOS OLIGODENDRÓCITOS DA MIELINA**

Juiz de Fora

2013

RUBENS MURILO GIBAILE SOARES

AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DA NEURITE ÓPTICA EM MODELO ANIMAL DE ENCEFALOMIELITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL INDUZIDO POR DUAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GLICOPROTEÍNA DOS OLIGODENDRÓCITOS DA MIELINA

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Doutorado em Saúde, área de concentração em Saúde Brasileira, do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Saúde.

Orientadora: Professora Doutora Ana Paula Ferreira

Coorientadora: Professora Doutora Maria Christina Marques Nogueira Castanon

Juiz de Fora

2013

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Soares, Rubens Murilo Gibaile.

Avaliação da Cinética da Neurite Óptica em Modelo Animal de Encefalomielite Autoimune Experimental Induzido por Duas Diferentes Concentrações de Glicoproteína dos Oligodendrócitos da Mielina / Rubens Murilo Gibaile Soares. -- 2013.

98 p. : il.

Orientador: Ana Paula Ferreira

Coorientador: Maria Christina Marques Nogueira Castanon
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde Brasileira, 2013.

1. Escore clínico de Encefalomielite Autoimune Experimental e escore de infiltrado inflamatório no nervo óptico. . 2. Infiltrado inflamatório nos nervos ópticos.. 3. Desmielinização nos nervos ópticos.. 4. Detecção imuno-histoquímica de CD4 e CD8 nos nervos ópticos. 5. Produção da quimiocina CCL5 nos nervos ópticos.. I. Ferreira, Ana Paula, orient. II. Castanon, Maria Christina Marques Nogueira, coorient. III. Título.

RUBENS MURILO GIBAILE SOARES

AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DA NEURITE ÓPTICA EM MODELO ANIMAL DE ENCEFALOMIELITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL INDUZIDO POR DUAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GLICOPROTEÍNA DOS OLIGODENDRÓCITOS DA MIELINA

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Doutorado em Saúde, área de concentração em Saúde Brasileira, do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Saúde.

Defesa em: __/__/__

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Paula Ferreira – Orientadora
Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Maria Aparecida de Souza
Departamento de Patologia, Universidade Federal de Uberlândia

Prof. Dr. Pietro Mainenti
Departamento de Patologia da UNIPAC Juiz de Fora

Dra. Marta Halfeld Ferrari Alves Lacordia
Departamento de Oftalmologia do Hospital Universitário, Universidade Federal de Juiz de Fora

Professora Doutora Maria Christina Marques Nogueira Castanon
Departamento de Morfologia, Universidade Federal de Juiz de Fora

Dedicatórias

A Deus, nosso Pai, infinitamente Amoroso, Justo e Bom, pela benção da vida e pela sublime oportunidade desta reencarnação.

A Jesus, nosso Mestre e Amigo Maior, pelo amparo e assistência espiritual, percebidos em cada momento desta existência, a me sustentar os passos.

À minha esposa Marcella, amor da minha vida, por compartilhar comigo cada passo desta trajetória. Sem sua dedicação, compreensão, carinho e apoio constantes, eu não chegaria ao término desta jornada. Meu amor eterno.

Aos meus queridos filhos, Isabella, Luísa e Felipe, almas amigas que alegam minha existência, renovando diariamente as minhas forças. Amo vocês pela eternidade.

Aos meus queridos pais, Paulo Rubens e Ivone, almas iluminadas, pelo amor, pela educação, pelo exemplo de vida, pelo amparo e apoio que sempre recebi. Minha gratidão e amor eternos.

Aos meus irmãos, Luciana, Rosa Maria, Luiz Fernando e Laila, pelo carinho, amor e amizade desenvolvidos no dia a dia. Minha admiração eterna.

Agradecimentos

À minha orientadora, Profa. Dra. Ana Paula Ferreira, por confiar no meu trabalho, permitir e proporcionar o meu amadurecimento científico e profissional, por me ensinar a postura correta diante das mais diversas situações.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Maria Christina Marques Nogueira Castanon, pela amizade, pela atenção, pela colaboração e pelos valiosos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Rogério Estevam Farias, pela colaboração e atenção.

À Profa. Dra. Alice Belleigoli Rezende, pela colaboração na fase inicial deste trabalho.

Aos colegas do Núcleo de Pesquisa e aos professores, pesquisadores, funcionários e acadêmicos de iniciação científica do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da UFJF, com os quais muito tenho aprendido.

Aos colegas de Pós-graduação, Sandra, Alyria, Caio e Marcilene, pela força e apoio, sempre presentes, e pela importante colaboração em várias etapas da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Lyderson Facio Viccini, pela força, pelo incentivo e pela amizade.

À Profa. Dra. Darcília Maria Nagen da Costa pela atenção, paciência e carinho, sempre presentes, na solução das questões ligadas à pós-graduação.

À Dra. Marta Halfeld Ferrari Alves Lacordia, pela oportunidade do convívio em minha trajetória profissional.

À CAPES, ao CNPq e à FAPEMIG, pelo suporte financeiro fornecido ao projeto.

“Não existe milagre; existe trabalho e progresso. Felicidade é consequência”.

Isabel Salomão de Campos

RESUMO

O modelo de Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE) é o mais utilizado no estudo da neurite óptica. Este trabalho tem como objetivo avaliar a cinética da neurite óptica em modelo animal de EAE induzido por duas diferentes concentrações de Glicoproteína dos Oligodendrócitos da Mielina (MOG). Para a indução da EAE foram utilizadas fêmeas de camundongos da linhagem C57BL/6, divididas em dois grupos, um grupo induzido com 100 µg de MOG₃₅₋₅₅ e um segundo grupo induzido com 300 µg de MOG₃₅₋₅₅. Os animais foram diariamente avaliados por meio da análise do escore clínico entre os dias zero e 58 pós-imunização. Nos dias 7, 10, 14, 21 ou 58 pós-imunização, os animais foram submetidos a eutanásia, e os nervos ópticos, dissecados em seu trajeto desde a parte posterior do globo ocular até o quiasma óptico. Posteriormente, foram avaliados os aspectos morfológico e imuno-histoquímico dos nervos ópticos. As alterações histopatológicas observadas em um ou em ambos os nervos ópticos consistiram de infiltrado celular inflamatório, tendo a neurite óptica gravidade diferente nos dois grupos estudados. A quimiocina CCL5 foi avaliada no dia 10 pós-imunização, primeiro dia em que foi detectado o infiltrado inflamatório. Os resultados sugerem que duas diferentes concentrações de MOG₃₅₋₅₅ utilizadas na indução do modelo animal de EAE induzem duas diferentes formas de evolução da neurite óptica.

Palavras-chave: Encefalomielite Autoimune Experimental. Esclerose Múltipla. Glicoproteína dos Oligodendrócitos da Mielina. Neurite Óptica.

ABSTRACT

The model of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) is the most used model in the study of optic neuritis. This study aims to evaluate the kinetics of optic neuritis in the EAE animal model induced by two different concentrations of Oligodendrocytes Myelin Glycoprotein (MOG). For induction of EAE were used female mice of the C57BL/6 lineage, divided into two groups, one group induced with 100 µg of MOG₃₅₋₅₅ and a second group induced with 300 µg of MOG₃₅₋₅₅. The animals were evaluated daily by analysis of clinical score between zero and 58 days after immunization. On days 7, 10, 14, 21 or 58 post-immunization, the animals were euthanized. The optic nerves were dissected from the back of the eyeball to the optic chiasm; subsequently the morphological and immunohistochemical aspects of the optic nerves were evaluated. The histopathological changes observed in one or in both optic nerves consisted of inflammatory cell infiltrate. Optic neuritis had different levels of severity in the two groups. The chemokine CCL5 was evaluated on day 10 post-immunization, the first day when the inflammatory infiltrate was detected. The results suggest that two different concentrations of MOG₃₅₋₅₅ used in the induction of EAE animal model induce two different forms of optic neuritis evolution.

Keywords: Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. Multiple Sclerosis. Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein. Optic Neuritis.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição mundial da prevalência de EM segundo a Organização Mundial de Saúde (WHOI, 2008)	18
Figura 2	Padrões clínicos da EM (Adaptado: LUBLIN, 2007)	19
Figura 3	Indução da EAE e dias de coleta dos nervos ópticos; dpi: dias pós-imunização; MOG: glicoproteína dos oligodendrócitos da mielina	39
Figura 4	Média do escore clínico de camundongos C57BL/6 imunizados ou não com (A) 100 µg do peptídeo MOG ₃₅₋₅₅ ou (B) 300 µg do peptídeo MOG ₃₅₋₅₅ , (n=8 por grupo). Os sinais clínicos foram registrados do dia 0 até o 58º dia após a imunização. Cada ponto representa a média ± erro padrão	53
Figura 5	Nervos ópticos e quiasma óptico de fêmea de camundongo da linhagem C57BL/6 submetida à indução de EAE com 100 µg do peptídeo glicoproteína dos oligodendrócitos da mielina (MOG ₃₅₋₅₅)	56
Figura 6	Nervos ópticos de camundongos C57BL/6 imunizados com 100 µg ou 300 µg do peptídeo glicoproteína dos oligodendrócitos da mielina (MOG ₃₅₋₅₅) e do grupo controle. As figuras são representativas da análise histopatológica de nervos ópticos de camundongos nos dias 7, 10, 14, 21 e 58 pós-imunização (dpi) com 100 µg MOG ₃₅₋₅₅ (C, D, G, H, K, L, O, P, S, T) ou 300 µg MOG ₃₅₋₅₅ (E, F, I, J, M, N, Q, R, U, V) e do grupo controle (A, B). As secções dos nervos ópticos foram coradas com H&E e capturadas com aumento de 200x e 400x, barra de escala = 50 µm	58
Figura 7	Nervo óptico de camundongos C57BL/6 imunizados com 100 µg do peptídeo glicoproteína dos oligodendrócitos da mielina (MOG ₃₅₋₅₅). As figuras são representativas da análise histopatológica de nervo óptico de camundongo no dia 14 pós-imunização. As secções do nervo óptico foram coradas com H&E e capturadas com aumento de 200x (A) e 400x (B), barra de escala = 20 µm	59
Figura 8	Nervos ópticos de camundongos C57BL/6 imunizados com 100 µg ou 300 µg do peptídeo glicoproteína dos oligodendrócitos da mielina (MOG ₃₅₋₅₅) e do grupo controle. As figuras são representativas da análise histoquímica de nervos ópticos de camundongos nos dias 7, 10, 14, 21 e 58 pós-imunização (dpi) com 100 µg MOG ₃₅₋₅₅ (B, D, F, H, J) ou 300 µg MOG ₃₅₋₅₅ (C, E, G, I, K) e do grupo controle (A). As secções dos nervos ópticos foram coradas com <i>Luxol Fast Blue</i> e capturadas com aumento de 400x, barra de escala = 20 µm. Seta = sítio de desmielinização	63
Figura 9	Detecção imuno-histoquímica de CD4 e CD8 no nervo óptico de camundongos C57BL/6 imunizados com 100 µg ou 300 µg do peptídeo glicoproteína dos oligodendrócitos da mielina (MOG ₃₅₋₅₅) e do grupo controle. As figuras são representativas da detecção imuno-histoquímica de CD4 (A, C, E) e CD8 (B, D, F) dos camundongos no dia 14 pós-imunização com 100 µg MOG ₃₅₋₅₅ (C, D) ou 300 µg MOG ₃₅₋₅₅ (E, F). Magnificação de 200x, barra de escala=50 µm	65
Figura 10	Avaliação morfométrica da imuno-histoquímica de CD4 e CD8 no nervo óptico de camundongos C57BL/6 imunizados com 100 µg ou 300 µg do peptídeo glicoproteína dos oligodendrócitos da mielina (MOG ₃₅₋₅₅) no dia 14 pós-imunização. As barras representam a média ± erro padrão. * p <0,05	66

- Figura 11** Escore clínico de Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE) nos dias em que os nervos ópticos foram avaliados (A) e escore de infiltrado inflamatório no nervo óptico (B) em camundongos C57BL/6 imunizados com 100 µg ou 300 µg do peptídeo glicoproteína dos oligodendrócitos da mielina (MOG₃₅₋₅₅). Cada ponto representa a média ± erro padrão (n=8 por grupo) 70
- Figura 12** Produção da quimiocina CCL5 nos nervos ópticos de camundongos C57BL/6, no dia 10 pós-imunização, nos seguintes grupos: (i) controle, (ii) 100 µg MOG₃₅₋₅₅, (iii) 300 µg MOG₃₅₋₅₅. As barras representam a média ± erro padrão (n = 8). ** p <0,01. *** p <0,001 72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Grupos experimentais	37
Tabela 2	Escala neurológica clínica para avaliar a EAE (Adaptada: DE PAULA <i>et al.</i> , 2008)	41
Tabela 3	Distribuição dos animais em grupos	43
Tabela 4	Escore clínico da EAE em camundongos C57BL/6 imunizados com 100 µg ou 300 µg do peptídeo glicoproteína dos oligodendrócitos da mielina (MOG ₃₅₋₅₅) nos dias em que os nervos ópticos foram avaliados. Cada ponto representa a média ± erro padrão	54
Tabela 5	Escore de infiltrado inflamatório nos nervos ópticos de camundongos C57BL/6 imunizados com 100 µg ou 300 µg do peptídeo glicoproteína dos oligodendrócitos da mielina (MOG ₃₅₋₅₅). Cada ponto representa a média ± erro padrão	61
Tabela 6	Frequência de manifestação clínica de Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE) e de infiltrado inflamatório no nervo óptico em camundongos C57BL/6 imunizados com 100 µg ou 300 µg do peptídeo glicoproteína dos oligodendrócitos da mielina (MOG ₃₅₋₅₅)	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Albumina de soro bovino
CCR	Receptor de quimiocina
CCL	Quimiocina
CD	Grupamento de diferenciação
DMSO	Dimetilsulfóxido
d.p.i	Dia(s) pós-imunização
EAE	Encefalomielite Autoimune Experimental
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio imunoadsorvente ligado à enzima
EM	Esclerose Múltipla
Foxp3	Fator de transcrição da família <i>Forkhead</i>
H&E	Hematoxilina e eosina
HLA- DR2	Antígeno de leucócito humano-DR2
IFN-γ	Interferon γ
IL	Interleucina
M	Mol
MG	Minas Gerais
μg	Micrograma
mg/Kg	Miligrama por quilo
mg/ml	Miligrama por mililitro
μg/ml	Micrograma por mililitro
mM	Milimol
mm	Milímetro
MOG	Glicoproteína dos oligodendrócitos da mielina
ng	Nanograma
PBM	Proteína básica da mielina
PLP	Proteína proteolípídica mielina

PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
RNA_m	Ácido ribonucleico mensageiro
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa
SNC	Sistema nervoso central
TGF-β	Fator de crescimento de transformação β
Th1	Linfócitos T <i>helper</i> 1
Th17	Linfócitos T <i>helper</i> 17
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	Esclerose Múltipla	17
2.2	Neurite Óptica	21
2.3	Resposta Imune na EAE	30
3	OBJETIVO	33
3.1	Objetivo Geral	33
3.2	Objetivos Específicos	34
4	MATERIAL E MÉTODO	35
4.1	Animais	35
4.2	Delineamento Experimental	36
4.3	Indução do Modelo de EAE	38
4.4	Avaliação Clínica da EAE	40
4.5	Eutanásia dos Animais e Coleta dos Nervos Ópticos	42
4.6	Análise Morfológica dos Nervos Ópticos	44
4.6.1	Macroscopia	44
4.6.2	Microscopia	45
4.6.2.1	Avaliação do Escore de Infiltrado Inflamatório no Nervo Óptico	46
4.6.2.2	Avaliação da Desmielinização no Nervo Óptico	47
4.6.3	Avaliação do Perfil CD4 e CD8 por Imuno-histoquímica	48
4.7	Quantificação da Quimiocina CCL5 no Nervo Óptico por ELISA	50
4.8	Análise Estatística	51
5	RESULTADOS	52
5.1	Avaliação Clínica da EAE	52
5.2	Análise Morfológica dos Nervos Ópticos	55
5.2.1	Macroscopia	55
5.2.2	Microscopia	57
5.2.2.1	Avaliação do Escore de Infiltrado Inflamatório no Nervo Óptico	60
5.2.2.2	Avaliação da Desmielinização no Nervo Óptico	62
5.2.2.3	Avaliação do Perfil CD4 e CD8 por Imuno-histoquímica	64
5.3	Frequência de Manifestações Clínicas de EAE e de Infiltrado Inflamatório no Nervo Óptico	67
5.4	Escore Clínico da EAE e Escore de Infiltrado Inflamatório no Nervo Óptico	69
5.5	Quantificação da Quimiocina CCL5 no Nervo Óptico por ELISA	71
6	DISCUSSÃO	73
7	CONCLUSÃO	79
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
	ANEXO	92

1 INTRODUÇÃO

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença neuroinflamatória crônica desmielinizante, caracterizada por ativação da resposta imune, com danos aos componentes do sistema nervoso central (SNC). Essa doença afeta adultos jovens, sendo, na maioria dos casos, grave e incapacitante.

Os padrões clínicos da EM são variáveis. Apesar de a EM afetar, potencialmente, qualquer parte do sistema nervoso central, aproximadamente de 15% a 20% dos pacientes com EM apresentam a neurite óptica como primeira manifestação da doença. A neurite óptica ocorre, em algum momento da EM, em 50% dos pacientes com doença estabelecida.

Um grande obstáculo nas pesquisas das desordens neuroinflamatórias do SNC é a sua inacessibilidade. O modelo de Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE) é o mais utilizado no estudo da neurite óptica na EM, permitindo um melhor entendimento da fisiopatologia dessa doença, sendo também relevante na avaliação da eficácia e dos mecanismos de ação de novas drogas para o seu tratamento.

A EAE pode seguir um curso remitente-recorrente ou crônico, com características que poderiam se aproximar da forma remitente-recorrente e das formas progressivas da EM, porém, os modelos experimentais utilizam animais de linhagens genéticas distintas ou diferentes antígenos e concentrações para a indução, o que dificulta a comparação e compreensão dos mecanismos moleculares responsáveis pela diferença entre essas duas formas de evolução clínica da doença.

Esta tese tem como objetivo avaliar a cinética da neurite óptica em modelo animal de EAE induzido por duas diferentes concentrações de glicoproteína dos oligodendrócitos da mielina (MOG).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Esclerose Múltipla

A EM é uma doença neuroinflamatória crônica desmielinizante, caracterizada por ativação da resposta imune com danos aos componentes do SNC (TRAPP *et al.*, 1998; COMPSTON, COLES, 2008).

A EM afeta, aproximadamente, 2,5 milhões de indivíduos no mundo, com incidência de cerca de sete novos casos por ano para cada 100.000 indivíduos. Ocorre em adultos jovens, geralmente com início entre 20 e 40 anos de idade, acometendo duas vezes mais as mulheres do que os homens e, mais frequentemente, a raça caucasiana (WALLIN, PAGE, KURTKEE, 2004). Algumas pessoas com EM não vivenciam completa incapacidade durante sua vida, entretanto, cerca de 60% dos indivíduos com EM tornam-se incapacitados aproximadamente 20 anos após o início da doença, o que influencia diretamente na qualidade de vida do paciente e ocasiona um elevado custo financeiro para a sociedade. Segundo a Organização Mundial de Saúde (2008) a estimativa mundial média da prevalência da EM é de 30 para cada 100.000 habitantes. A prevalência da EM é de 80 pessoas a cada 100.000 habitantes na Europa, 14,9 para o Mediterrâneo Oriental, 8,3 nas Américas, 5 no Pacífico Ocidental, 2,8 para o Sudeste da Ásia e 0,3 para a África (Figura 1).

A EM é uma desordem com extensiva variabilidade de apresentação clínica, sendo caracterizada por episódios que envolvem lesão de medula, nervo óptico, tronco encefálico e cerebelo (LUBLIN, 2007).

Os padrões clínicos da EM são variáveis, existindo, basicamente, quatro formas clínicas distintas: (1) EM Remitente Recorrente, na qual ocorrem surtos seguidos de recuperação completa ou de sequelas após a recuperação - os períodos entre os surtos são caracterizados por ausência de progressão da doença; (2) EM Secundária Progressiva, que inicia como Esclerose Múltipla Remitente Recorrente e evolui para uma doença progressiva, com ou sem surtos, pequenas remissões e platôs; (3) EM Primária Progressiva, que apresenta progressão da

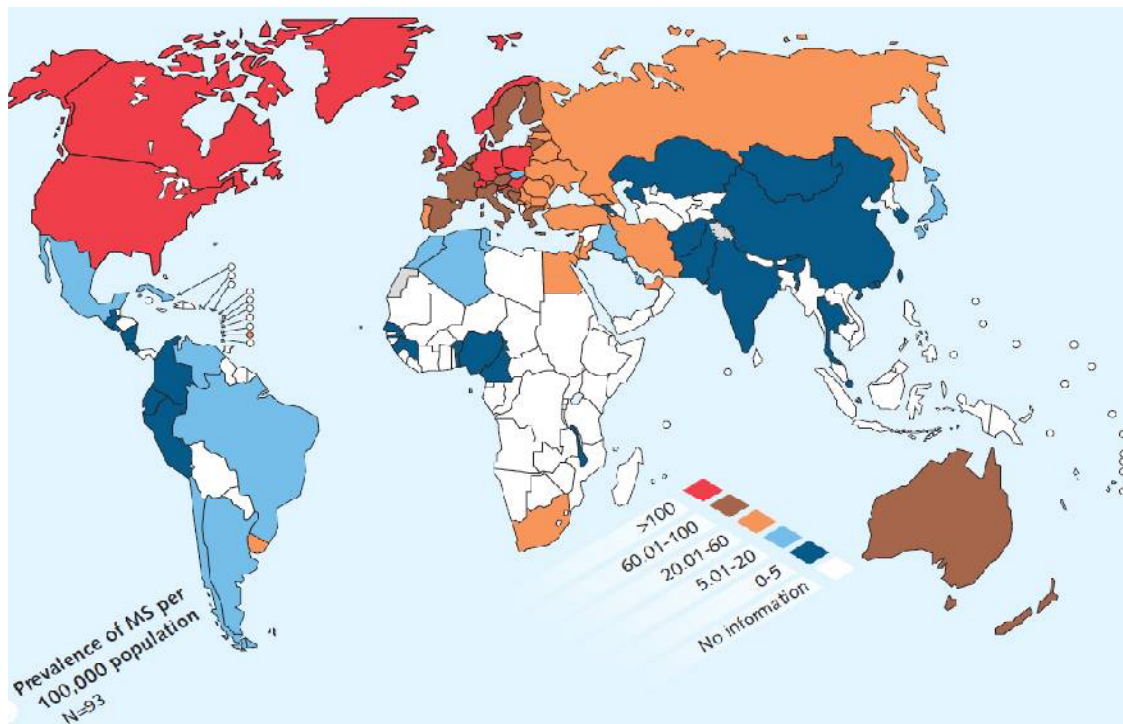


Figura 1 Distribuição mundial da prevalência de EM segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2008).

doença desde o início, com platôs ocasionais e pequenas melhoras temporárias, apresentando os pacientes uma piora contínua e gradual da sua condição sem surtos; (4) EM Progressiva Recorrente, em que ocorre progressão da doença desde o início, com surtos agudos, com ou sem recuperação completa e com progressão contínua entre os surtos. Na maioria dos casos, a EM é diagnosticada com o padrão clínico Remitente Recorrente (LUBLIN, 2007). Em pacientes não tratados, o curso clínico mais comum da EM envolve a forma Secundária Progressiva. A EM Primária Progressiva evolui de forma mais grave e agressiva (WEINSHENKER, 1989). A figura 2 esquematiza as quatro formas clínicas da EM.

Na EM há interrupção da condução nervosa na substância branca do encéfalo, do tronco encefálico, do nervo óptico e da medula espinhal. A desmielinização é um processo patológico no qual as fibras nervosas, normalmente mielinizadas, perdem sua camada protetora de mielina. O processo pelo qual se formam as lesões na EM é complexo e inclui múltiplos fatores da resposta imunológica, entre eles citocinas, quimiocinas e imunoglobulinas. Presume-se que

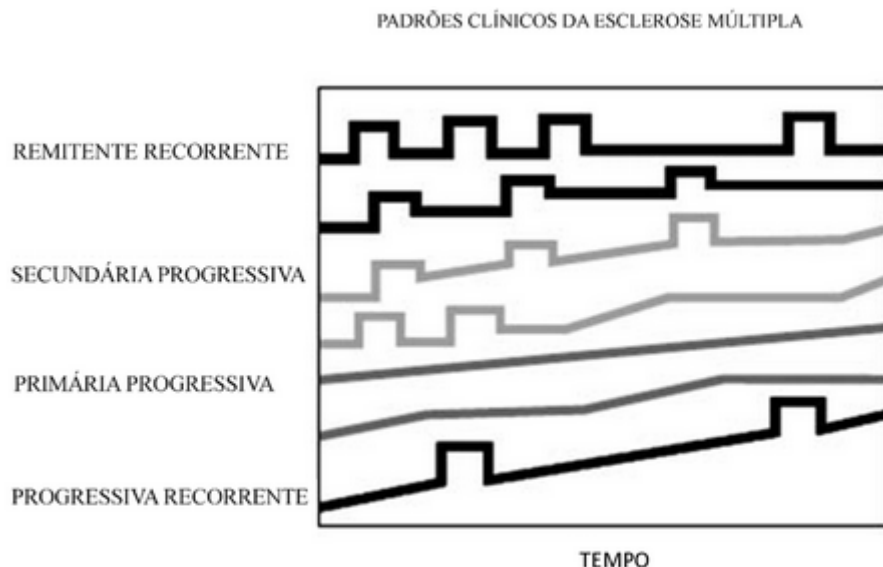


Figura 2 Padrões clínicos da EM (Adaptado: LUBLIN, 2007).

indivíduos geneticamente susceptíveis, ao serem expostos a fatores ambientais, tais como infecção viral ou bacteriana no SNC, apresentam aumento da permeabilidade da barreira hemato-encefálica, permitindo a penetração de células do sistema imune sistêmico, principalmente os linfócitos T CD4⁺ (YONG, 2002; NAIR, FREDERICK, MILLER, 2008). Os auto-antígenos da mielina, sobretudo a Proteína Básica da Mielina (PBM) e a Glicoproteína dos Oligodendrócitos da Mielina (MOG) são apresentados por macrófagos a linfócitos T CD4⁺, desencadeando uma cascata que libera mediadores inflamatórios e culmina com a lesão da bainha de mielina e do tecido nervoso adjacente (SANTOS *et al.*, 2005).

As diferentes formas clínicas da EM podem ser explicadas pelos graus de inflamação, desmielinização, remielinização e neurodegeneração (PETERSON, ROBERT, FUJINAMI, 2007). O processo de reparação da lesão, chamado de remielinização, é inadequado. Além da desmielinização progressiva, há um processo neurodegenerativo, envolvendo os neurônios (DENG, SRIRAM, 2005). Observa-se um infiltrado peri-vascular de linfócitos T CD8⁺ (SHI *et al.*, 2007), com formação de placas ao redor dos ventrículos laterais e do corpo caloso, no córtex e na substância branca subcortical, no nervo óptico, no tronco encefálico e na medula espinhal (COMPSTON, COLES, 2008).

A EM apresenta diversas manifestações clínicas como diminuição das funções motora, sensitiva, cerebelar, cognitiva, urogenital, mental e visual. Entre as manifestações clínicas iniciais, as mais frequentes são sintomas motores, sensitivos, neurite óptica e síndromes de tronco cerebral e cerebelo (NESSLER, BRÜCK, 2010).

Um grande obstáculo nas pesquisas das desordens neuroinflamatórias do sistema nervoso central é a sua inacessibilidade. Portanto, as investigações são limitadas aos estágios finais das doenças e às alterações sistêmicas que ocorrem durante a progressão da enfermidade, sendo que nenhuma das duas situações pode refletir o processo patológico no sistema nervoso central. Isso dificulta o desenvolvimento de terapias efetivas contra a EM. Na tentativa de superar essas limitações, desenvolveu-se o modelo de EAE. A EAE é o modelo animal mais amplamente utilizado para o estudo da EM, sendo que várias razões contribuem para seu uso como modelo de autoimunidade antígeno-induzida, tais como o predomínio de inflamação com o envolvimento de células mononucleares e a desmielinização, características que se assemelham às da EM (SOSPEDRA, MARTIN, 2005; ERCOLINI e MILLER, 2006; YIN *et al.*, 2010).

2.2 Neurite Óptica

A neurite óptica caracteriza-se por ser um processo inflamatório agudo desmielinizante do nervo óptico, sendo uma das principais complicações encontradas em pacientes com EM, etiologia mais frequentemente associada à neurite óptica. Outras etiologias raras de neurite óptica são Neurite Óptica Isolada, Doença de Devic e Doença de Schilder (KANSKI, 2007).

A neurite óptica associada à EM é uma doença inflamatória órgão-específica de difícil controle, que evolui com sequelas, mesmo com os tratamentos convencionais e, conseqüentemente, tem um prognóstico ruim. Nessa doença, a lesão da via óptica envolve mais frequentemente os nervos ópticos, causando neurite óptica. A desmielinização pode ocasionalmente envolver o quiasma e raramente o trato óptico e as radiações ópticas (MOWRY, BALCER, GALETTA 2007; KANSKI, 2007).

Aproximadamente de 15% a 20% dos pacientes com EM apresentam a neurite óptica como primeira manifestação clínica da doença. A neurite óptica ocorre, em algum momento da EM, em 50% dos pacientes com doença estabelecida. O risco total num período de 10 anos de desenvolver EM seguida de um episódio agudo de neurite óptica é de 38% (BECK *et al.*, 2003; KANSKI, 2007).

O risco de pacientes com neurite óptica apresentarem EM subsequente é aumentado com o início do inverno, com a positividade de expressão do HLA-DR2 e com o fenômeno de Uhtoff, no qual há a piora dos sintomas devido à elevação da temperatura corporal, tal como ocorre durante o exercício físico e o banho quente (KANSKI, 2007).

Na EM as lesões histopatológicas envolvem as porções mais internas do nervo óptico. São observadas degeneração axonal e morte das células gliais desse nervo, além de morte de células ganglionares da retina, resultando em deficiência visual (GUYTON, *et al.*, 2005).

Na fase aguda da neurite óptica, observam-se linfócitos e células plasmáticas, principalmente ao redor de vasos sanguíneos. Na fase de cicatrização ocorre gliose nas áreas de desmielinização (YANOFF, SASSANI, 2009).

O quadro clínico da neurite óptica inicia-se com diminuição sub-aguda da visão monocular. Alguns pacientes sentem fenômenos visuais positivos, chamados de fosfenos, caracterizados por pequenos clarões ou centelhas brancas ou coloridas. Desconforto ocular ou ao redor dos olhos é comum e, não raro, exacerbado pelos movimentos oculares. O desconforto pode preceder ou acompanhar a perda visual e, frequentemente, dura poucos dias. Cefaleia frontal e sensibilidade ocular estão presentes em alguns pacientes. Os sinais incluem diminuição da acuidade visual monocular, defeito pupilar aferente relativo (pupila de Marcus Gunn), discromatopsia, diminuição da apreciação do brilho da luz e comprometimento da sensibilidade ao contraste, disco óptico normal (já que na maioria dos casos tem-se neurite retro-bulbar, sendo raro encontrar papilite), defeito no campo visual e diminuição da camada de fibras nervosas da retina (células ganglionares) no exame de tomografia de coerência óptica. A acuidade visual piora por vários dias (não mais que duas semanas) e, então, inicia-se a recuperação visual, que dura entre duas e quatro semanas. A recuperação inicial da acuidade visual é razoavelmente rápida e, então, estabiliza-se, mas essa recuperação continua, progressivamente, num período de 6 a 12 meses (KANSKI, 2007; OSBONE, VOLPE, 2009).

A neurite óptica pode ser tratada utilizando-se succinato sódico de metilprednisolona intra-venosa ou de interferon beta-1a intramuscular (KANSKI, 2007). Apesar de essas medicações poderem acelerar a recuperação da neurite óptica, não há tratamento, até o presente momento, que impeça o dano axonal (ABOU ZEID, BHATTI, 2008; SHAMS, PLANT, 2009).

Os agentes terapêuticos utilizados na neurite óptica não promovem a cura da doença, tampouco a recuperação total dos pacientes. Aproximadamente 85% dos pacientes, submetidos a tratamento ou não, recuperam a acuidade visual de 20/40 ou melhor (Escala de Snellen). Frequentemente permanecem anormais a visão de cores, a apreciação do brilho da luz e a sensibilidade ao contraste. Um defeito pupilar aferente leve pode persistir, e pode ocorrer a atrofia óptica, principalmente nos quadros recorrentes. Cerca de 10% dos pacientes desenvolvem neurite óptica crônica, caracterizada por perda visual progressiva ou gradativa não associada a períodos de recuperação (KANSKI, 2007).

O modelo de EAE é o mais utilizado no estudo da neurite óptica, auxiliando no estudo da fisiopatologia dessa doença, sendo também relevante na avaliação da eficácia e dos mecanismos de ação de novas drogas para o seu tratamento. Diferentes estudos têm demonstrado que a linhagem genética do animal e o antigénio utilizado na indução estão relacionados a diferentes formas de desenvolvimento patológico de EAE e da neurite óptica (SHAO *et al.*, 2004; KUERTEN *et al.*, 2007; BERARD *et al.*, 2010). A linhagem de camundongos C57BL/6 tem sido bastante útil na indução de neurite óptica em EAE, especialmente quando se utiliza a MOG em sua indução (SHAO *et al.*, 2004; GUO *et al.*, 2009; TIAN *et al.*, 2010; GUO *et al.*, 2011; QUINN *et al.*, 2011; CHAUDHARY *et al.*, 2011; MATSUDA *et al.*, 2012). O peptídeo MOG tem sido utilizado em estudos que apoiam a possibilidade dele ser o antígeno-alvo primário no desenvolvimento da EM, mesmo sendo este muito menos abundante na bainha de mielina do que a PBM (ADELMANN *et al.*, 1995; SOSPEDRA e MARTIN, 2005). Respostas imunológicas à PBM ou à proteína proteolípídica mielina-específica (PLP) induzem lesões localizadas predominantemente na medula espinhal, enquanto a imunização com MOG gera, principalmente, lesão no nervo óptico e na medula espinhal (BERGER *et al.*, 1997).

Até agora, são poucas as pesquisas que analisam a lesão do nervo óptico usando modelos animais de EM, já que a maioria dos estudos concentra-se na avaliação da lesão do cérebro e da medula espinhal, e não no nervo óptico (KEZUKA *et al.*, 2011). No entanto, alguns trabalhos demonstraram o desenvolvimento de neurite óptica em modelo de EAE. Na década de 1990, quando a EAE estava sendo desenvolvida, um estudo mostrou que a imunização de camundongos SJL/J com PLP resultou no aparecimento de neurite óptica no dia 17 pós-imunização, único ponto avaliado nesse estudo (POTTER, BIGAZZI, 1992), demonstrando a natureza aguda do envolvimento do nervo óptico em EAE, semelhante ao que ocorre na EM, que pode ter a neurite óptica como uma das primeiras manifestações clínicas. O exame histopatológico do nervo óptico mostrou aumento da celularidade acompanhada por área focal de inflamação submeníngea com infiltrado de neutrófilos, monócitos e linfócitos, assemelhando-se aos achados da neurite óptica associada à EM em humanos. Todos os camundongos que desenvolveram neurite óptica (4 camundongos de 5 animais submetidos à indução

de EAE apresentaram sorologia com anticorpos anti-PLP circulantes (POTTER, BIGAZZI, 1992).

Da mesma forma, ao se utilizar a MOG para imunizar camundongos *Brown Norway*, também se encontrou neurite óptica dentro de 3 semanas em 90% dos animais, além de encefalomielite (STORCH *et al.*, 1998). Esses estudos demonstram, claramente, que, em certas linhagens de roedores, a neurite óptica se desenvolve como resultado da imunização com antígenos derivados de neurônios.

A relação da inflamação do nervo óptico com a perda de células ganglionares da retina durante a neurite óptica aguda em EAE foi avaliada em estudo no qual se realizou a imunização de camundongos SJL/J com PLP. Células ganglionares da retina foram marcadas com *Flourogold* e contadas e os nervos ópticos foram avaliados, histologicamente, quanto à presença de infiltrados celulares inflamatórios. Os autores observaram que a neurite óptica não foi detectada antes do dia 9 pós-imunização. A incidência de neurite óptica foi de 30% no dia 9 pós-imunização e aumentou para mais de 70% no dia 11 pós-imunização, permanecendo elevada até o dia 18 pós-imunização. Em contraste, não houve perda de células ganglionares da retina em olhos com neurite óptica até o dia 14 pós-imunização. Houve redução de 43,1% no número de células ganglionares da retina no dia 14 pós-imunização e redução de 50,8% no número de células ganglionares da retina no dia 18 pós-imunização. Nenhuma perda de células ganglionares da retina ocorreu em olhos sem neurite óptica. Os autores demonstraram que a inflamação precede a perda de células ganglionares da retina, sugerindo que a perda neuronal durante a neurite óptica ocorre secundariamente ao processo inflamatório (SHINDLER *et al.*, 2006).

Em estudo que utilizou camundongos C57BL/6 e imunização com o peptídeo MOG₃₅₋₅₅, EAE e neurite óptica foram avaliadas no dia 13 pós-imunização, tendo sido observadas tanto EAE (em 18 de 22 camundongos submetidos à indução de EAE) quanto neurite óptica (em 14 de 22 camundongos submetidos à indução de EAE). Em alguns camundongos houve o desenvolvimento de EAE sem neurite óptica (4 de 18 animais submetidos à indução de EAE) e em outros houve o desenvolvimento da neurite óptica sem EAE (3 de 14 animais submetidos à indução de EAE). Nesses animais que desenvolveram neurite óptica observou-se infiltrado inflamatório difuso no nervo óptico. Além disso, quando os linfócitos T desses camundongos foram injetados intra-peritonealmente (imunização adotiva) em

camundongos normais, a neurite óptica também se desenvolveu nesses camundongos (5 de 8 animais submetidos à imunização adotiva). Nesses animais que desenvolveram neurite óptica observou-se infiltrado inflamatório em nódulos no nervo óptico. Esses achados indicam que os linfócitos T estão envolvidos na patogênese da neurite óptica e são importantes no desenvolvimento de neurite óptica autoimune (SHAO *et al.*, 2004).

Como prova de que linfócitos T MOG-específicos são um importante fator patogênico, observou-se que 47% (7 de 15) dos camundongos transgênicos contendo linfócitos T com receptor celular T específico para MOG₃₅₋₅₅ desenvolveram neurite óptica espontaneamente, com curso clínico semelhante a EM em seres humanos. Esses camundongos não apresentavam sinais clínicos de EAE e apresentavam alterações histológicas no nervo óptico, que consistia de infiltrado mononuclear sub-pial e endoneural com ativa desmielinização desse nervo, porém sem lesão detectável no cérebro ou na medula espinhal. Esses resultados sugerem que o desenvolvimento de neurite óptica espontânea nesses camundongos pode estar relacionado a um aumento da expressão de autoantígeno nos nervos ópticos (BETTELLI *et al.*, 2003). Além disso, quando esses camundongos transgênicos foram cruzados com camundongos em que um terço das células B é específico para MOG, com consequente aumento da apresentação de MOG aos linfócitos T geneticamente modificados, 60% dos camundongos desenvolveram, espontaneamente, uma forma grave da EAE e 100% desenvolveram neurite óptica (BETTELLI *et al.*, 2006). O desenvolvimento de neurite óptica após a indução de EAE sugere uma origem autoimune da inflamação do nervo óptico observada na EM.

Em outro estudo, os autores geraram camundongos transgênicos que expressam as cadeias α e β do receptor de linfócitos T específico para MOG₃₅₋₅₅. Esses animais produziram, espontaneamente, linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺ que reconheceram a MOG e produziram citocinas pró-inflamatórias, predominantemente IL-17 e IFN- γ . Esse trabalho demonstrou que os linfócitos T CD4⁺ têm um papel dominante na EAE e que os linfócitos T CD8⁺ podem induzir neurite óptica e EAE clinicamente leve (ANDERSON *et al.*, 2012).

Alguns autores sugerem que os nervos ópticos expressam níveis mais elevados de MOG do que a medula espinhal (SHAO *et al.*, 2004; BETTELLI *et al.*,

2003). Sabe-se que a MOG é expressa na superfície mais externa da bainha de mielina. No nervo óptico, em que a relação volume/superfície de mielina é baixa, a expressão de MOG é aumentada em relação à PLP que está concentrada na mielina compacta. Efeitos do diferencial de concentração do antígeno podeira tornar-se clinicamente significativa no contexto da imunização sub-ótima com MOG (menor dose de MOG). Isso poderia explicar a natureza aguda do envolvimento do nervo óptico em EAE, semelhante ao que ocorre na EM, em que a neurite óptica pode ser uma das primeiras manifestações clínicas, já que nos estágios iniciais da doença há baixa concentração de linfócitos T ativados específicos para MOG (BETTELLI *et al.*, 2003).

Esse grupo de autores utilizou a coloração *Luxol Fast Blue* para demonstrar áreas de desmielinização no nervo óptico (BETTELLI *et al.*, 2003), já que essa coloração impregna a bainha de mielina na estrutura histológica normal (KEZUKA *et al.*, 2011).

Tian e colaboradores (2010) observaram o papel de sub-populações de linfócitos T *helper* na patogênese da neurite óptica em EAE. Os autores utilizaram fêmeas de camundongos da linhagem C57BL/6, com idade entre 8 e 10 semanas, sendo a imunização realizada com injeção subcutânea, no dorso dos camundongos, de 200 µg de MOG₃₅₋₅₅ e adjuvante completo de Freund suplementado com 4 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis*, além de 400 ng de toxina *pertussis* injetada por via intra-peritoneal nos dias 0 e 2 pós-imunização. Nos dias 11, 15 e 19 pós-imunização, os nervos ópticos foram dissecados para estudo morfológico. A concentração das citocinas IL-17, IFN-γ e IL-4 foi avaliada por ELISA. Os autores utilizaram RT-PCR para avaliar a expressão gênica de IL-17, IFN-γ, IL-4 e Foxp3 e propuseram que há um desequilíbrio das quatro sub-populações de linfócitos T CD4⁺ na neurite óptica associada à EAE. A concentração da proteína IL-17 no nervo óptico mostrou-se significativamente aumentada no dia 11 pós-imunização, e a concentração da proteína IFN-γ no dia 19 pós-imunização. A concentração da proteína IL-4 no nervo óptico diminuiu ligeiramente no dia 19 pós-imunização. A expressão do RNAm de IL-17, IFN-γ e IL-4 foi coerente com a produção de proteínas. Esse trabalho propôs que a diminuição de expressão de RNAm Foxp3 de linfócitos T regulatórios (Treg Foxp3) no nervo óptico pode ser um ponto chave para o desenvolvimento de neurite óptica, que a IL-17 pode mediar o processo inflamatório nas fases iniciais da neurite óptica

e que o IFN- γ pode agravar a lesão inflamatória durante a fase de pico da neurite óptica.

Outros autores descreveram a cinética da perda de células ganglionares da retina, além de avaliarem a visão por meio de respostas optocinéticas. Foram utilizadas fêmeas de camundongos da linhagem C57BL/6, com idade entre 6 e 7 semanas, sendo a imunização realizada com injeção subcutânea de 150 μ g de MOG₃₅₋₅₅ e adjuvante completo de Freund suplementado com 2,5 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis*, além de 200 ng de toxina *pertussis* injetada por via intra-peritoneal nos dias 0 e 2 pós-imunização. Os camundongos foram sacrificados nos dias 15, 25, 35, 40 ou 50 pós-imunização, sendo as células ganglionares da retina contadas e os nervos ópticos avaliados, histologicamente, quanto à presença de infiltrado inflamatório (H&E). Os sinais clínicos de EAE iniciaram no dia 8 pós-imunização e a queda significativa da visão foi observada depois do dia 30 pós-imunização. A neurite óptica foi detectada em mais de 80% dos nervos ópticos nos dias 15 e 25 pós-imunização e em mais de 60% dos nervos ópticos no dia 50 pós-imunização. No entanto, a perda de células ganglionares da retina ocorreu somente entre os dias 35 e 50 pós-imunização (QUINN *et al.*, 2011).

Alguns fármacos foram alvo de estudos em neurite óptica e EAE. Primeiramente, Guo e colaboradores (2009) demonstraram que o tratamento oral com geranilgeranilacetona na dose diária de 500 mg/Kg durante 22 dias melhorou o grau de desmielinização do nervo óptico e reduziu a perda de células na camada de células ganglionares da retina no dia 22 pós-imunização, único ponto de avaliação desse estudo. Foram utilizadas fêmeas de camundongos da linhagem C57BL/6, com idade entre 6 e 8 semanas, sendo a imunização realizada com injeção subcutânea de 100 μ g de MOG₃₅₋₅₅ e adjuvante completo de Freund suplementado com 500 μ g de *Mycobacterium tuberculosis* H37 RA, além de 500 ng de toxina *pertussis* injetada por via intra-peritoneal nos dias 0 e 2 pós-imunização. Apesar dos bons resultados observados quanto à neurite óptica, o mesmo não ocorreu com relação às alterações na medula espinhal.

Em outro estudo, esse grupo de autores demonstrou que o tratamento oral com espermidina, substância que age como um antioxidante, melhorou o grau de desmielinização do nervo óptico e reduziu a perda de células na camada de células ganglionares da retina. Foram utilizadas fêmeas de camundongos da linhagem

C57BL/6, com idade entre 6 e 8 semanas, sendo a imunização realizada com injeção subcutânea de 100 µg de MOG₃₅₋₅₅ e adjuvante completo de Freund suplementado com 500 µg de *Mycobacterium tuberculosis* H37 RA, além de 500 ng de toxina *pertussis* injetada por via intra-peritoneal nos dias 0 e 2 pós-imunização. Nos animais tratados com espermidina, medicação esta adicionada à água potável a 30 mM durante 25 dias, houve melhora do grau de desmielinização do nervo óptico e redução da perda de células na camada de células ganglionares da retina no dia 25 pós-imunização, único ponto de avaliação desse estudo, além de diminuição da gravidade da EAE (GUO *et al.*, 2011). Esse grupo de autores também utilizou a coloração *Luxol Fast Blue* para demonstrar áreas de desmielinização no nervo óptico (GUO *et al.*, 2009; GUO *et al.*, 2011).

Chaudhary e colaboradores (2011) demonstraram que o tratamento com ácido lipoico na dose diária de 100 mg/Kg, administrado por via subcutânea, entre os dias 8 e 21 pós-imunização (paradigma de supressão precoce) e entre os dias 13 e 24 pós-imunização (paradigma de supressão tardio) reduziu a lesão axonal em ambos os paradigmas experimentais. Foram utilizadas fêmeas de camundongos da linhagem C57BL/6, com idade entre 6 e 8 semanas, sendo a imunização realizada com injeção subcutânea de 200 µg de MOG₃₅₋₅₅ e adjuvante completo de Freund suplementado com 400 µg de *Mycobacterium tuberculosis*, além de 75 ng de toxina *pertussis* injetada por via intra-peritoneal no dia 0 e 200 ng de toxina *pertussis* injetada por via intra-peritoneal no dia 2 pós-imunização. Os autores propuseram que o ácido lipoico não apenas suprimiu a neurite óptica (paradigma de supressão precoce), como também foi eficaz terapeuticamente (paradigma de supressão tardio), sugerindo que a diminuição da lesão axonal associada à administração de ácido lipoico tenha sido secundária à acentuada redução de células inflamatórias no nervo óptico, embora seja possível que essa medicação também confira alguma neuroproteção direta.

Adamus e colaboradores (2011) demonstraram a eficácia da imunoterapia com ligante de receptor recombinante de células T (RTL342M) na prevenção de neurite óptica em camundongos transgênicos HLA-DR2 (DRA:DRβ1*1501) “humanizados”. Esses animais, machos ou fêmeas com idade entre 8 e 10 semanas, foram imunizados com injeção subcutânea de 200 µg de MOG₃₅₋₅₅ e adjuvante completo de Freund suplementado com 400 µg de *Mycobacterium tuberculosis*

H37RA em quatro pontos dos flancos, além de 70 ng de toxina *pertussis* injetada por via intra-peritoneal nos dias 0 e 2 pós-imunização. Foram administradas doses diárias de 20 µg de RTL342M por via subcutânea durante cinco dias a partir do dia 8 pós-imunização, quando ocorreu o início da neurite óptica (cerca de 8 a 9 dias após a imunização), antes do início dos sinais clínicos da EAE, que ocorreu 11 a 12 dias após a imunização. Os camundongos foram eutanasiados nos dias 16, 30 ou 62 pós-imunização. A incidência de neurite óptica foi de 100% e esta foi detectada, histologicamente, pela presença de infiltrado inflamatório em cortes longitudinais e transversais dos nervos ópticos corados com H&E. A gravidade da neurite óptica no grupo tratado com RTL342M foi significativamente reduzida no dia 16 pós-imunização, com aumento da intensidade nos dias 30 e 62 pós-imunização, sugerindo que o ligante de receptor recombinante de células T foi eficaz em interromper o influxo de células inflamatórias nas fases iniciais, sendo necessárias doses adicionais para inibir o desenvolvimento adicional da inflamação, a fim de atingir o benefício terapêutico completo nesses camundongos. A desmielinização do nervo óptico foi detectada pela coloração *Luxol Fast Blue*, sendo menos intensa no grupo tratado com RTL342M em relação ao grupo não tratado.

Em estudo recente, outros autores demonstraram a eficácia da terapia gênica com peptídeo relacionado ao gene calcitonina (CGRP) na prevenção de neurite óptica em camundongos C57BL/6 imunizados com 200 µg MOG₃₅₋₅₅. A avaliação do infiltrado inflamatório no nervo óptico foi realizada no dia 14 pós-imunização. Os autores demonstraram que células dendríticas transfectadas com CGRP preveniram o desenvolvimento de neurite óptica em EAE. A terapia gênica desenvolveu pontuação média de 1 para neurite óptica no grupo transfectado com CGRP, comparado com 2 no grupo falsamente transfectado (MATSUDA *et al*, 2012).

2.3 Resposta Imune na EAE

A infiltração de leucócitos contribui para a patogênese da inflamação autoimune no SNC, ocorrendo não só na EM, mas também na EAE. Supõe-se que o recrutamento de leucócitos e sua ativação no SNC resultem nos sintomas e na progressão da doença. No modelo de EAE, o início da inflamação no SNC envolve linfócitos T específicos para a mielina, que são ativados nos linfonodos periféricos e posteriormente migram para o SNC para serem reapresentados aos antígenos da mielina, por células apresentadoras de antígeno (ENGELHARDT, RANSOHOFF, 2005; REBOLDI, *et al.*, 2009).

O acesso de linfócitos T ao SNC pode ocorrer através do plexo coroide para o espaço subaracnoide, que contém o líquido cefalorraquidiano ou ocorrer a partir do sangue, diretamente para o parênquima cerebral através da barreira hematoencefálica, via espaço perivascular (KIVISAKK *et al.*, 2003; ENGELHARDT, RANSOHOFF, 2005; KIVISAKK *et al.*, 2006). Esta migração celular para o SNC envolve integrinas e moléculas de adesão que permitem o rolamento e a adesão das células T através das paredes dos vasos (PICCIO *et al.*, 2002). Além disso, há a ação de quimiocinas, que são potentes citocinas com atividade quimiotática, produzidas localmente e que, a partir da interação com o seu receptor na superfície celular, promovem o direcionamento da migração e a chegada de leucócitos e outras células ao sítio inflamatório (McQUIBBAN *et al.*, 2002; BELMADANI *et al.*, 2006).

Os leucócitos expressam uma variedade de receptores de quimiocinas inflamatórias, mais consistentemente CCR1, CCR2 e CCR5 que têm sido identificados em diversos tecidos e fluidos inflamatórios, tanto de lesões cerebrais na EM (BALASHOV *et al.*, 1999), quanto em modelos de doenças neurológicas, incluindo a EAE (ROTTMAN *et al.*, 2000).

A expressão de CCR1 e seus ligantes CCL3, CCL5 e CCL7 já foi demonstrada em lesões cerebrais inflamatórias (MAHAD *et al.*, 2004). A quimiocina CCL5 é produzida por linfócitos T, células endoteliais e eosinófilos e é atrativa para monócitos, macrófagos e linfócitos T (ZLOTNIK, YOSHIE, 2000). Amostras de líquido cefalorraquidiano isoladas de pacientes com EM na forma clínica Recorrente Remitente contêm níveis significativamente mais elevados de CCL5 (SORENSEN *et*

al., 1999). CCL5 transcritos também estão expressos em lesões de desmielinização ativa em amostras de cérebro pós-morte de pacientes com EM, e linfócitos T periféricos isolados de pacientes com EM exibiram intensificação da migração em resposta a CCL5 (BOVEN *et al.*, 2000; ZANG *et al.*, 2001). Pacientes com neurite óptica aguda monossintomática apresentaram alta concentração de linfócitos T expressando receptor para CCL5 no fluido cérebro-espinhal (TELESHOVA *et al.*, 2002). Santos e colaboradores descreveram que CCL5 desempenha um papel importante na adesão de leucócitos na microcirculação cerebral em EAE, demonstrando a relevância dessa quimiocina no recrutamento de leucócitos para o cérebro de camundongos nesse modelo animal (SANTOS *et al.*, 2005). Além disso, a redução de CCL5 pode estar relacionada a uma baixa migração de linfócitos Th1 para o SNC e também pode ser associada com a melhora dos sinais clínicos da EAE (GLABINSKI *et al.*, 2002; JALOSINSKI *et al.*, 2008).

Inicialmente a EAE foi caracterizada como sendo uma doença mediada por linfócitos CD4+ T *helper* 1 (Th1), com a produção de citocinas relacionada a esse tipo celular, como o interferon- γ (IFN- γ) e a interleucina-12 (IL-12) (MARCONDES *et al.*, 2005; SOSPEDRA, MARTIN, 2005; WENSKY, 2005; De PAULA *et al.*, 2008).

Outros estudos mostram também a influência de linfócitos T *helper* 17 (Th17) no desenvolvimento da EM, através da citocina pró-inflamatória interleucina-17 (IL-17) (LAURENCE, O'SHEA, 2007). As citocinas interleucina-6 (IL-6) e interleucina-23 (IL-23), produzidas por macrófagos, células dendríticas e micróglia, são responsáveis pela polarização de linfócitos Th17, encontrados no líquido cefalorraquidiano de pacientes com EM. Em protocolo experimental, utilizando camundongos geneticamente deficientes em IL-6, IL-23 e IL-17 não foi possível induzir a EAE, indicando a importância dessas citocinas no seu desenvolvimento (ZELANTE *et al.*, 2007; KROENKE, 2008; QUINTANA, WEINER, 2009; MIOSSEC, 2009).

A IL-17 tem sido caracterizada como uma molécula pró-inflamatória que estimula células epiteliais, endoteliais e fibroblastos a produzirem outras citocinas e quimiocinas como IL-6, proteínas inflamatórias de macrófagos, fatores estimulantes de granulócitos e proteínas quimioatraentes de monócitos (PARK *et al.*, 2005).

A migração inicial de linfócitos Th17 para o cérebro parece estar relacionada com o receptor de quimiocina CCR6, constitutivamente expressa por linfócitos Th17,

que encontra o seu ligante CCL20 em células epiteliais do plexo coroide e regula a entrada desses linfócitos no SNC (REBOLDI *et al.*, 2009).

Novos subtipos de linfócitos Th17 têm sido propostos: o linfócito Th17 patogênico que é caracterizado pela produção de IL-17, interleucina-22 (IL-22) e IFN- γ e o linfócito Th17 regulador que produz IL-17 e interleucina-10 (IL-10). Nesse caso, a IL-10 produzida é responsável pela regulação da EAE, melhorando os sinais clínicos da doença. As citocinas envolvidas na diferenciação desses dois tipos de linfócitos são IL-23, IL-6 e fator transformador de crescimento tumoral- β (TGF- β) (IMLER JR., PETRO, 2008; LOUTEN, BONIFACE, MALEFYT, 2009).

Além dos mecanismos de resposta imune celular, a produção de auto-anticorpos tem sido também apresentada como um importante fator na desmielinização dos axônios. O aumento das concentrações de imunoglobulinas no líquido cefalorraquidiano e a presença de anticorpos anti-mielina indicam o envolvimento de linfócitos B (resposta humoral) no processo inflamatório dessa doença (MARTIN, MCFARLAND, MCFARLIND, 1992; BETELLI *et al.*, 2006; KRISHNAMOORTHY, HOLZ, WEKERLE, 2007).

Com base no exposto acima, é possível concluir que o modelo de EAE é extremamente útil para a avaliação dos mecanismos imunológicos envolvidos na neurite óptica em pacientes com EM, contribuindo para a compreensão da sua fisiopatologia, assim como, para o desenvolvimento de novos fármacos destinados ao seu tratamento.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Avaliar parâmetros morfológicos e imunológicos envolvidos na cinética da neurite óptica em modelo animal de EAE induzido por duas diferentes concentrações do peptídeo MOG₃₅₋₅₅.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o escore clínico dos animais induzidos com EAE, utilizando 100 µg ou 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ para a indução;
- Avaliar o perfil do infiltrado celular por meio da análise histopatológica com a coloração de hematoxilina-eosina e o perfil imuno-histoquímico dos marcadores CD4 e CD8 no nervo óptico dos animais imunizados com 100 µg ou 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅;
- Avaliar o nível de desmielinização por meio da análise histoquímica com a coloração *Luxol Fast Blue* no nervo óptico dos animais imunizados com 100 µg ou 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅;
- Quantificar os níveis de quimiocinas CCL5 no homogenato de nervos ópticos dos animais imunizados com 100 µg ou 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Para a indução da EAE foram utilizadas fêmeas de camundongos da linhagem C57BL/6, com idade entre 4 e 6 semanas, provenientes do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora-MG (UFJF). Os animais foram mantidos na sala de manutenção do laboratório de Imunologia em estantes ventiladas e dieta *ad libitum*. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios do Código Brasileiro para a Utilização de Animais de Laboratório. Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa em Animais da UFJF, tendo sido aprovado (Protocolo nº 007/2011).

4.2 Delineamento Experimental

Os camundongos foram divididos em três grupos experimentais (8 animais/grupo/ponto de eutanásia). No primeiro grupo (100 µg MOG₃₅₋₅₅) a EAE foi induzida utilizando-se 100 µg MOG₃₅₋₅₅. No segundo grupo (300 µg MOG₃₅₋₅₅) a EAE foi induzida utilizando-se 300 µg MOG₃₅₋₅₅. No terceiro grupo (Controle) não houve indução de EAE. Os três grupos estão representados na Tabela 1.

Tabela 1 Grupos experimentais.

Grupos avaliados (8 animais/grupo/ponto de eutanásia)	Indução da EAE
100 µg MOG ₃₅₋₅₅	.100 µg do peptídeo MOG ₃₅₋₅₅ .400 µg /ml de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> atenuado H37RA .300 ng de toxina <i>pertussis</i>
300 µg MOG ₃₅₋₅₅	.300 µg do peptídeo MOG ₃₅₋₅₅ .400 µg /ml de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> atenuado H37RA .300 ng de toxina <i>pertussis</i>
Controle	Não induzido

4.3 Indução do Modelo de EAE

A EAE foi induzida em todos os animais dos dois primeiros grupos. Cada animal do primeiro grupo foi imunizado, por via subcutânea em ambos os lados da base da cauda, com 100 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, sintetizado no laboratório de Biofísica da Universidade de São Paulo, emulsificado em adjuvante completo de Freund (Sigma Chemical Co., Saint Louis, USA), suplementado com 400 µg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* atenuado H37RA (Difco Laboratories, Detroit, USA). Cada animal do segundo grupo foi imunizado, por via subcutânea em ambos os lados da base da cauda, com 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ sintetizado no laboratório de Biofísica da Universidade de São Paulo, emulsificado em adjuvante completo de Freund (Sigma Chemical Co., Saint Louis, USA), suplementado com 400 µg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* atenuado H37RA (Difco Laboratories, Detroit, USA). No dia da imunização e após 48 horas, foram injetados, por via intraperitoneal, 300 ng de toxina *pertussis* (Sigma Chemical Co., Saint Louis, USA) em cada animal tanto do grupo 100 µg MOG₃₅₋₅₅, quanto do grupo 300 µg MOG₃₅₋₅₅. A indução da EAE está representada na Figura 3.

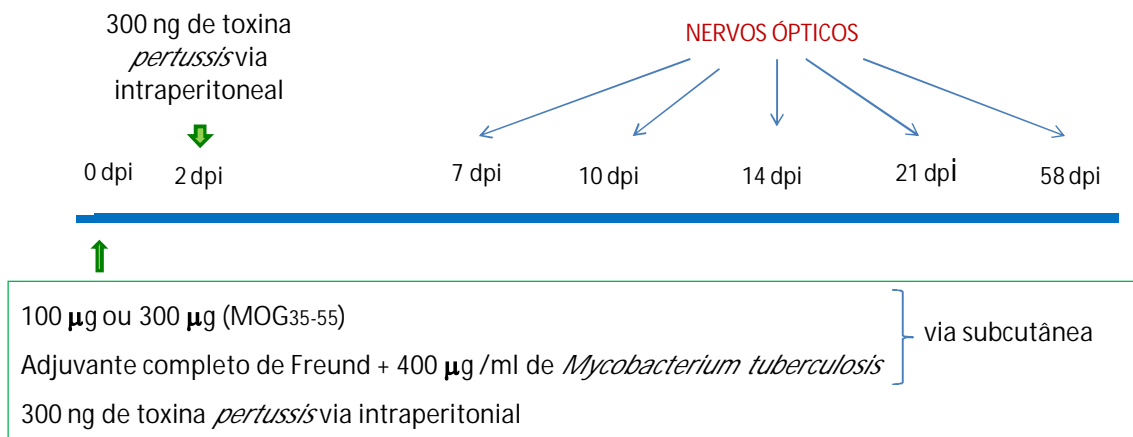


Figura 3 Indução da EAE e dias de coleta dos nervos ópticos; dpi: dias pós-imunização; MOG: glicoproteína dos oligodendrócitos da mielina.

4.4 Avaliação Clínica da EAE

A avaliação do escore clínico foi realizada do dia 0 ao dia 58 pós-imunização, sendo que os animais foram clinicamente avaliados e classificados com relação à incapacidade neurológica por meio da escala apresentada na Tabela 2, adaptada por DE PAULA e colaboradores (2008). O escore final de cada animal correspondeu ao somatório da pontuação obtida em todos os parâmetros avaliados em um mesmo dia.

Tabela 2 Escala neurológica clínica para avaliar a EAE (Adaptada: DE PAULA *et al.*, 2008).

Parte do animal	Sinais clínicos	Escore
Cauda	Nenhum sinal clínico	0
	Perda do tônus muscular da cauda	1
	Paralisia	2
Membro-posterior	Nenhum sinal clínico	0
	Fraqueza de uma das patas do animal	1
	Fraqueza de ambas as patas do animal	2
	Paralisia de uma das patas	3
	Paralisia de ambas as patas	4
Membro-anterior	Nenhum sinal clínico	0
	Fraqueza de uma ou de ambas as patas do animal	1
	Paralisia de uma ou de ambas as patas do animal	2
Bexiga	Continência	0
	Incontinência	1

4.5 Eutanásia dos Animais e Coleta dos Nervos Ópticos

A eutanásia foi realizada com dose letal de Xilazina (10 mg/Kg) e quetamina (150 mg/Kg) nos dias 7, 10, 14, 21 e 58 pós-imunização. Depois que os animais estavam completamente anestesiados, parte deles foi perfundida intracardialmente com solução de formalina 10% para a retirada dos nervos ópticos para a análise histológica (8 animais/grupo).

No dia 10 pós-imunização, 8 animais/grupo foram perfundidos com PBS para a retirada dos nervos ópticos nos quais foi realizada a quantificação da quimiocina CCL5 por ELISA.

Após a remoção do encéfalo, executada no sentido anteroposterior, foi removida a parede posterior das órbitas e cada nervo óptico de todos os animais foi dissecado em seu trajeto desde a parte posterior do globo ocular até, inclusive, o quiasma óptico.

A distribuição dos animais em grupos está representada na Tabela 3.

Tabela 3 Distribuição dos animais em grupos.

Grupos/dias avaliados	Parâmetro avaliado (números de animais utilizados)		
	Controle	100 µg de MOG ₃₅₋₅₅	300 µg de MOG ₃₅₋₅₅
7° dia pós-imunização	Análise Morfológica (8)	Análise Morfológica (8)	Análise Morfológica (8)
10° dia pós-imunização	Quimiocina (8) Análise Morfológica (8)	Quimiocina (8) Análise Morfológica (8)	Quimiocina (8) Análise Morfológica (8)
14° dia pós-imunização	Análise Morfológica (8)	Análise Morfológica (8)	Análise Morfológica (8)
21° dia pós-imunização	Análise Morfológica (8)	Análise Morfológica (8)	Análise Morfológica (8)
58° dia pós-imunização	Análise Morfológica (8)	Análise Morfológica (8)	Análise Morfológica (8)

4.6 Análise Morfológica dos Nervos Ópticos

4.6.1 Macroscopia

O comprimento e a largura dos nervos ópticos dissecados foram medidos em milímetros (mm). Observou-se, nos nervos ópticos, a presença ou ausência de alterações macroscópicas do tecido.

Cada peça cirúrgica foi, imediatamente após a exérese, imersa em solução fixadora (formol a 10%) por um período mínimo de 24 horas.

4.6.2 Microscopia

Após a análise macroscópica, as amostras - nervos ópticos e respectivos quiasmas - foram submetidas ao processamento histológico, ou seja, desidratadas em concentrações crescentes de álcool (álcool 70º, 80º, 90º, absoluto 1, 2 e 3), diafanizadas em duas trocas de xilol, embebidas e incluídas em parafina. Os blocos confeccionados foram submetidos à microtomia em secções longitudinais para a obtenção de cortes de 4 micra de espessura utilizando-se micrótomo rotativo manual (American Optical 820).

4.6.2.1 Avaliação do Escore de Infiltrado Inflamatório no Nervo Óptico

As lâminas foram coradas em Hematoxilina e Eosina (H&E) para análise histológica e graduação das alterações histológicas. Cortes de 4 micra de espessura obtidos dos blocos de parafina contendo os nervos ópticos incluídos foram desparafinizados em dois banhos de xilol, de 15 minutos cada, hidratados em soluções alcoólicas de concentrações decrescentes (100%, 90%, 80% e 70%) por 3 minutos cada e hidratados em água corrente por 5 minutos. Em seguida, os cortes foram contra-corados pela Hematoxilina de Harris por 50 segundos e lavados em água corrente durante 20 minutos, sendo, em seguida, corados pela Eosina por 1 minuto e 30 segundos.

Os cortes foram analisados em toda a sua extensão por dois diferentes observadores, que utilizaram o microscópio Olympus BX51 em aumentos de 40x, 100x, 200x e 400x. A partir desta avaliação, foram selecionadas campos em aumentos de 200x e 400x para documentação fotográfica dos aspectos histológicos do grupo controle e de cada grupo imunizado, utilizando-se o *software* Image Pro Plus (Media CyberneticsTM).

Os cortes histológicos corados em H&E foram avaliados de forma semi-quantitativa quanto à presença ou ausência de infiltrado inflamatório. O escore histopatológico utilizado (ADAMUS *et al.*, 2011) baseou-se na presença de infiltrado de células inflamatórias, utilizando-se a escala:

0 - Nenhuma infiltração;

1 - Tênuve infiltração celular no nervo óptico ou na bainha do nervo óptico;

2 - Moderada infiltração celular no nervo óptico ou na bainha do nervo óptico;

3 - Intensa infiltração celular no nervo óptico ou na bainha do nervo óptico;

4 - Maciça infiltração celular no nervo óptico ou na bainha do nervo óptico e infiltração nodular.

A presença de neurite óptica foi determinada por qualquer nível de inflamação do nervo óptico (pontuação de 1 a 4), enquanto os nervos sem inflamação identificável (pontuação 0) foram considerados como ausência de neurite óptica.

4.6.2.2 Avaliação da Desmielinização no Nervó Óptico

Cortes adicionais foram submetidos a estudo histoquímico utilizando-se a coloração *Luxol Fast Blue* específica para fibras mielínicas. Assim, cortes de 4 micra de espessura obtidos dos blocos de parafina contendo os nervos ópticos incluídos foram desparafinados em dois banhos de xilol, de 15 minutos cada, hidratados em soluções alcoólicas de concentrações decrescentes (100%, 95%) e incubados *overnight* a 60° em solução de *Luxol Fast Blue*.

Posteriormente, as lâminas foram lavadas em álcool a 95% e água destilada, submersas em solução de carbono de lítio por 5 segundos, submetidas a dois mergulhos em álcool a 70% por 10 segundos e lavadas em água destilada. Esses últimos três passos foram repetidos até haver contraste, ficando a mielina marcada em azul. Os cortes foram submersos em álcool a 70% e corados pela Eosina e Cresil Violeta por 1 minuto, sendo lavados após essas colorações. Em seguida, foram desidratados em álcool a 95% e a 100% e montados com Entellan (Merck) e lamínulas de vidro.

Os cortes foram analisados em toda a sua extensão por dois diferentes observadores, que utilizaram o microscópio Olympus BX51 em aumento de 40x, 100x, 200x e 400x. A desmielinização do nervo óptico foi detectada pela observação de áreas não coradas pelo *Luxol Fast Blue* (*Luxol Fast Blue* negativas), indicando destruição da bainha de mielina, ou seja, correspondentes às áreas desmielinizadas, associadas à infiltração celular no nervo óptico.

A partir dessa análise, foram selecionadas imagens em aumentos de 200x e 400x para documentação fotográfica do aspecto histoquímico das fibras de mielina do grupo controle e de cada grupo imunizado, utilizando-se o *software* Image Pro Plus (Media Cybernetics™).

4.6.3 Avaliação do Perfil CD4 e CD8 por Imuno-histoquímica

Cortes adicionais foram avaliados imuno-histoquimicamente. Foram selecionados, aleatoriamente, um bloco de parafina do grupo controle e um bloco de parafina de cada grupo imunizado, contendo os nervos ópticos incluídos dos dias 7, 10, 14, 21 e 58 pós-imunização. Cortes de 4 micra de espessura obtidos desses blocos foram colocados em lâminas carregadas positivamente. A desparafinação, a reidratação e a recuperação do epítipo foram realizadas por meio do método de indução de recuperação por aquecimento (HIER) utilizando-se o Trilogy™ (Cell Marque) em conjunção com banho maria. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada por meio da imersão em peróxido de hidrogênio a 3% e metanol a 70% durante 20 minutos. Após esta etapa, as lâminas foram lavadas em água corrente. Os cortes na lâmina foram ciclados por caneta hidrofóbica Dako cód. S2002. Os anticorpos usados foram: anticorpo *rabbit anti-mouse* CD4 (CMC10431020, 1:50, Cell Marque; recuperação antigênica com tampão de fosfato) e anticorpo *rat anti-mouse* CD8 (CMC10829022 1:50, Cell Marque; recuperação antigênica com tampão de fosfato). O anticorpo primário devidamente diluído no diluidor de anticorpo Dako cód K80006 foi então aplicado. As secções foram então incubadas durante 30 minutos. Após esta etapa, as lâminas receberam dois banhos de 5 minutos cada com tampão PBS ph 7.6. Posteriormente, foi aplicado o kit HiDef HRP Mouse/Rabbit Polymer Detection System. Após esta etapa, as lâminas receberam dois banhos de 5 minutos cada com tampão PBS ph 7.6. Em seguida, foi aplicado cromógeno Dako cód K8000. As lâminas foram então lavadas em água destilada e contracoradas em hematoxilina de Harris, desidratadas em 4 banhos de álcool anidro e 4 banhos de xilol e finalmente montadas com goma (Proquímios) para fixação das lamínulas.

Os cortes foram analisados em toda a sua extensão por dois diferentes observadores, e a identificação de células expressando CD4 e CD8 foi realizada, utilizando-se o microscópio Olympus BX51 em aumento de 40x, 100x, 200x e 400x. A morfometria foi realizada utilizando a contagem manual do *software* Image Pro Plus (Media Cybernetics™). Foram avaliados em média, seis campos de grande aumento (objetiva de 20x) em todos os grupos considerados. A partir dessa análise, foram selecionadas imagens em aumentos de 200x e 400x para documentação

fotográfica dos aspectos imuno-histoquímicos do grupo controle e de cada grupo imunizado, utilizando-se o *software* Image Pro Plus (Media Cybernetics™).

4.7 Quantificação da Quimiocina CCL5 no Nervó Óptico por ELISA

Para determinar se o início do infiltrado inflamatório dos nervos ópticos poderia estar relacionado com a produção de CCL5, foram retirados os nervos ópticos de oito camundongos de cada grupo imunizado e do grupo controle, para a quantificação da quimiocina CCL5 no décimo dia pós-imunização, primeiro dia em que foi detectado o infiltrado inflamatório.

O homogenato de nervo óptico foi submetido à técnica de ELISA para a determinação dos níveis da quimiocina CCL5. As placas de ELISA foram sensibilizadas com o anticorpo de captura, diluído em tampão específico, e incubadas por 18 horas a 4°C. Em seguida, lavadas quatro vezes com PBS-Tween e bloqueadas com PBS + Soro Fetal Bovino (10%) por 1 hora. Após esse período, as placas foram lavadas novamente quatro vezes e, em seguida, as amostras dos animais utilizados e os padrões da quimiocina CCL5 foram adicionados. As placas foram então incubadas por 18 horas a 4°C. Após a incubação, as placas foram lavadas quatro vezes, o 2º anticorpo biotinilado e o complexo enzimático foram acrescentados e as placas foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente. Após a incubação as placas foram lavadas seis vezes e a reação foi revelada pela adição do substrato contendo TMB (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) e bloqueio com ácido sulfúrico 2N. A leitura foi realizada em leitor de microplacas (SPECTRAMAX 190, Molecular Devices) a 450 nm. As quantidades da quimiocina CCL5 foram calculadas a partir das curvas-padrão, obtidas pelas diferentes concentrações dos respectivos recombinantes (BD Biosciences Pharmigen, San Diego, CA, USA). Os resultados foram expressos como a concentração média dos sobrenadantes do nervo óptico, para cada grupo.

4.8 Análise Estatística

Os resultados representam três experimentos independentes e foram apresentados como a média \pm erro padrão. Todos os dados foram analisados por meio do teste de Kruskal-Wallis (GraphPad Prism 5,00), e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação Clínica da EAE

No grupo controle, não imunizado, durante todo o período avaliado não foi observado nenhum sinal clínico neurológico da EAE. Por outro lado, os sinais clínicos de EAE foram observados no grupo 100 µg MOG₃₅₋₅₅ e no grupo 300 µg MOG₃₅₋₅₅ e não se observou diferença na média de escore clínico entre os grupos.

O escore clínico da EAE em camundongos C57BL/6 imunizados com 100 µg ou 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ do dia 0 até o 58º dia após a imunização está demonstrado na Figura 4.

Na Tabela 4 está representado o escore clínico da EAE em camundongos C57BL/6 imunizados com 100 µg ou 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ nos dias em que os nervos ópticos foram avaliados.

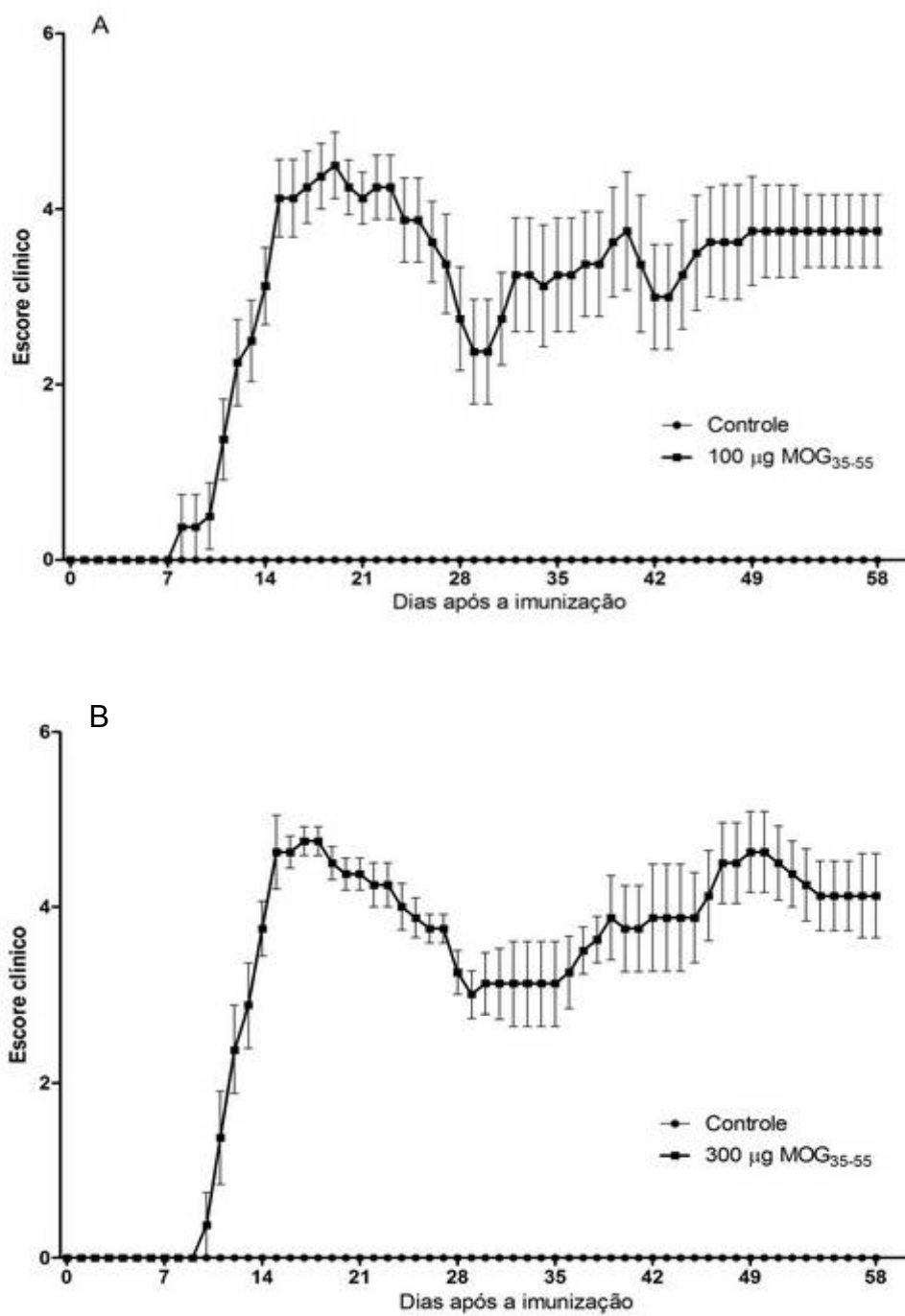


Figura 4 Média do escore clínico de camundongos C57BL/6 imunizados ou não com (A) 100 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ ou (B) 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, (n=8 por grupo). Os sinais clínicos foram registrados do dia 0 até o 58º dia após a imunização. Cada ponto representa a média ± erro padrão.

Tabela 4 Escore clínico da EAE em camundongos C57BL/6 imunizados com 100 µg ou 300 µg do peptídeo glicoproteína dos oligodendrócitos da mielina (MOG₃₅₋₅₅) nos dias em que os nervos ópticos foram avaliados. Cada ponto representa a média ± erro padrão.

Grupos	Dias pós-imunização				
	7	10	14	21	58
100 µg MOG ₃₅₋₅₅	0	0.5±0.38	3.13±0.44	4.25±0.37	3.63±0.46
300 µg MOG ₃₅₋₅₅	0	0.38±0.38	3.75±0.31	4.38±0.18	4.13±0.48

5.2 Análise Morfológica dos Nervos Ópticos

5.2.1 Macroscopia

Os nervos ópticos dissecados foram obtidos preservando-se o quiasma óptico e apresentaram, em média, 5 mm de comprimento por 0,7 mm de largura. Não foram observadas alterações à macroscopia do tecido (Figura 5).

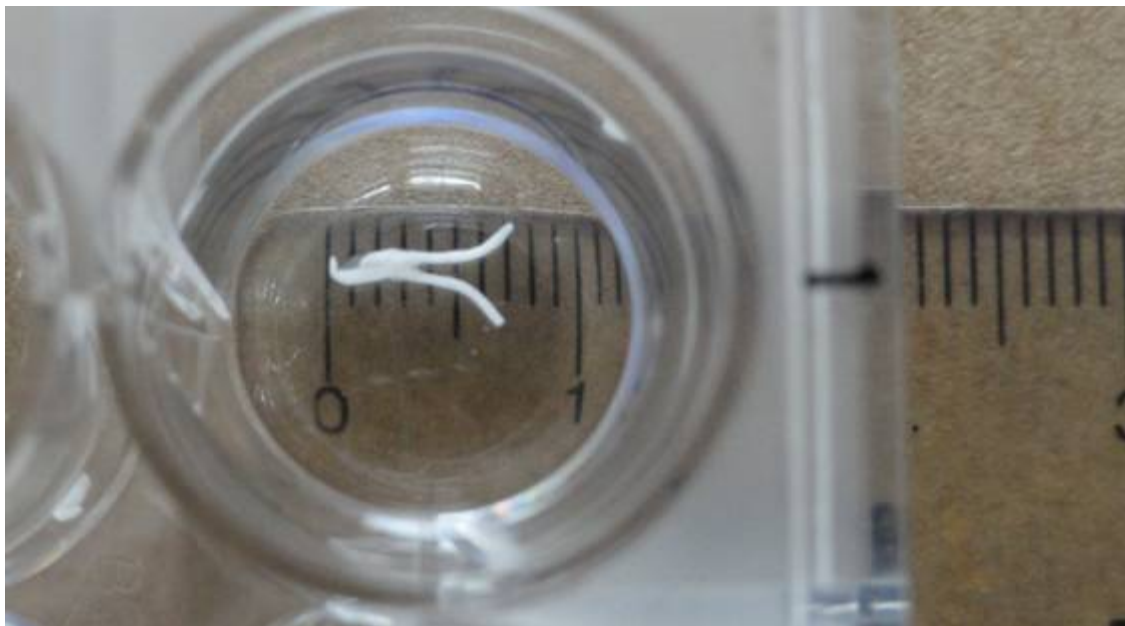


Figura 5 Nervos ópticos e quiasma óptico de fêmea de camundongo da linhagem C57BL/6 submetida à indução de EAE com 100 μ g do peptídeo glicoproteína dos oligodendrócitos da mielina (MOG₃₅₋₅₅).

5.2.2 Microscopia

Os cortes histológicos dos nervos ópticos do grupo controle demonstraram estrutura histológica normal sem a presença de infiltrado celular inflamatório (Figura 6A,B). As alterações histopatológicas observadas em um ou em ambos os nervos ópticos dos camundongos dos dois grupos em que a EAE foi induzida consistiram de infiltrado celular mononuclear sub-pial e/ou endoneural, difuso ou focal, desses nervos (Figuras 6I-V e 7).

No dia 7 pós-imunização, não foi observado infiltrado celular inflamatório nos animais de ambos os grupos imunizados (Figura 6C-F). No dia 10 pós-imunização, observou-se tênue infiltrado inflamatório apenas no grupo 300 µg MOG₃₅₋₅₅ (Figura 6I,J). O infiltrado inflamatório foi maior no dia 14 pós-imunização em ambos os grupos imunizados, mas foi mais intenso no grupo 100 µg MOG₃₅₋₅₅ (Figura 6K,L) do que no grupo 300 µg MOG₃₅₋₅₅ (Figura 6M,N). Após esse ponto, uma redução gradual do infiltrado inflamatório foi observada em ambos os grupos imunizados (Figura 6O-V).

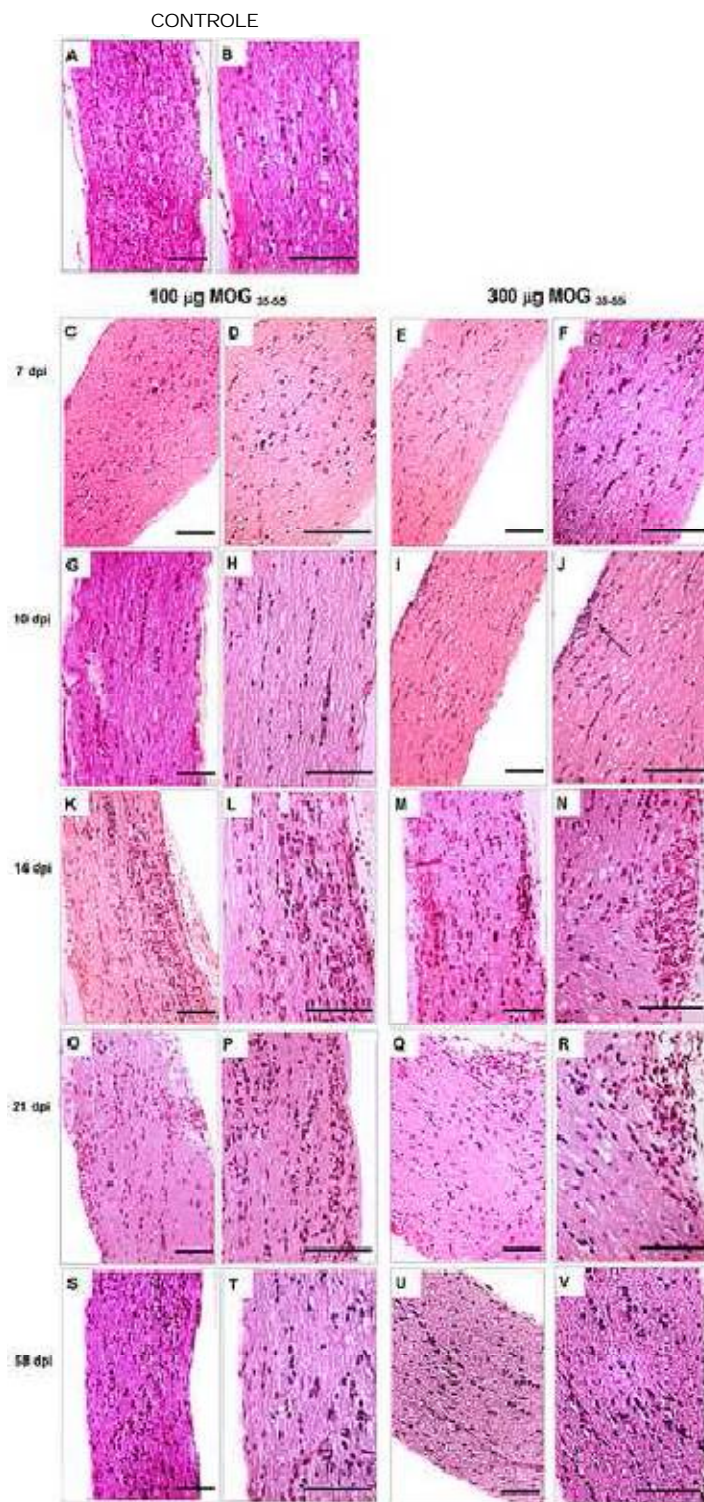


Figura 6 Nervos ópticos de camundongos C57BL/6 imunizados com 100 µg ou 300 µg do peptídeo glicoproteína dos oligodendrócitos da mielina (MOG₃₅₋₅₅) e do grupo controle. As figuras são representativas da análise histopatológica de nervos ópticos de camundongos nos dias 7, 10, 14, 21 e 58 pós-imunização (dpi) com 100 µg MOG₃₅₋₅₅ (C, D, G, H, K, L, O, P, S, T) ou 300 µg MOG₃₅₋₅₅ (E, F, I, J, M, N, Q, R, U, V) e do grupo controle (A, B). As secções dos nervos ópticos foram coradas com H&E e capturadas com aumento de 200x e 400x, barra de escala = 50 µm.

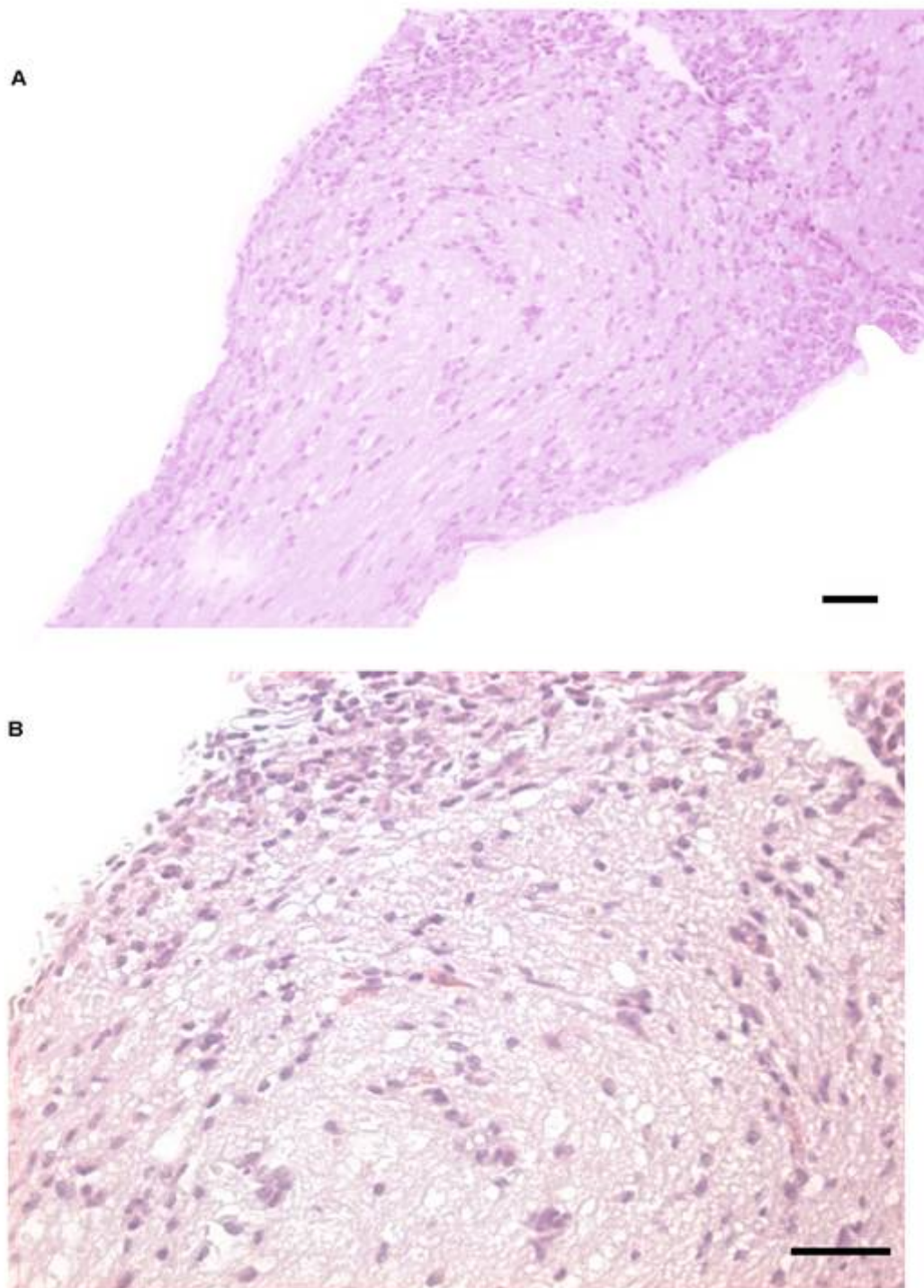


Figura 7 Nervo óptico de camundongos C57BL/6 imunizados com 100 µg do peptídeo glicoproteína dos oligodendrócitos da mielina (MOG₃₅₋₅₅). As figuras são representativas da análise histopatológica de nervo óptico de camundongo no dia 14 pós-imunização. As secções do nervo óptico foram coradas com H&E e capturadas com aumento de 200x (A) e 400x (B), barra de escala = 20 µm.

5.2.2.1 Avaliação do Escore de Infiltrado Inflamatório no Nervo Óptico

No grupo controle, não imunizado, durante todo o período avaliado não foi observada nenhuma alteração histológica relacionada à inflamação do nervo óptico. Por outro lado, a inflamação relacionada à neurite óptica foi observada nos grupos 100 µg MOG₃₅₋₅₅ e 300 µg MOG₃₅₋₅₅, havendo diferença na média de escore de inflamação da neurite óptica. No dia 7 pós-imunização, nenhum animal apresentou infiltrado celular inflamatório nos nervos ópticos. No dia 10 pós-imunização o infiltrado celular inflamatório não ocorreu em nenhum animal do grupo 100 µg MOG₃₅₋₅₅ e o escore de infiltrado inflamatório nos nervos ópticos foi presente no grupo 300 µg MOG₃₅₋₅₅. No dia 14 pós-imunização foi detectado o pico do escore de infiltrado inflamatório nos nervos ópticos em ambos os grupos em que a EAE foi induzida. Do dia 21 pós-imunização em diante há uma redução gradativa do escore de infiltrado inflamatório nos nervos ópticos em ambos os grupos.

O escore de infiltrado inflamatório no nervo óptico em camundongos C57BL/6 imunizados com 100 µg ou 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ está demonstrado na Tabela 5.

Tabela 5 Escore de infiltrado inflamatório nos nervos ópticos de camundongos C57BL/6 imunizados com 100 µg ou 300 µg do peptídeo glicoproteína dos oligodendrócitos da mielina (MOG₃₅₋₅₅). Cada ponto representa a média ± erro padrão.

Grupos	Dias pós-imunização				
	7	10	14	21	58
100 µg MOG ₃₅₋₅₅	0	0	3.13±0.44	1.67±0.42	1.33±0.88
300 µg MOG ₃₅₋₅₅	0	1.13±0.13	1.75±0.25	0.75±0.25	0.75±0.25

5.2.2.2 Avaliação da Desmielinização no Nervo Óptico

Os cortes histológicos dos nervos ópticos do grupo controle demonstraram estrutura histológica dentro dos limites da normalidade com áreas positivas para a histoquímica *Luxol Fast Blue* normal com áreas coradas pelo *Luxol Fast Blue* na bainha de mielina (Figura 8A). As alterações histoquímicas observadas em um ou em ambos os nervos ópticos dos camundongos dos dois grupos em que a EAE foi induzida consistiram de áreas *Luxol Fast Blue* negativas, associadas ao infiltrado inflamatório (Figura 8).

No dia 7 pós-imunização, foi observada estrutura histológica dentro dos limites da normalidade com áreas positivas para a histoquímica *Luxol Fast Blue* nos animais de ambos os grupos imunizados (Figura 8B,C). No dia 10 pós-imunização, observou-se tênue desmielinização apenas no grupo 300 µg MOG₃₅₋₅₅ (Figura 8E). No dia 14 pós-imunização, áreas isoladas de desmielinização foram observadas em ambos os grupos (Figura 8F,G). Nos dias 21 e 58 pós-imunização, o processo de desmielinização foi mais grave no grupo 100 µg MOG₃₅₋₅₅ (Figura 8H-K).

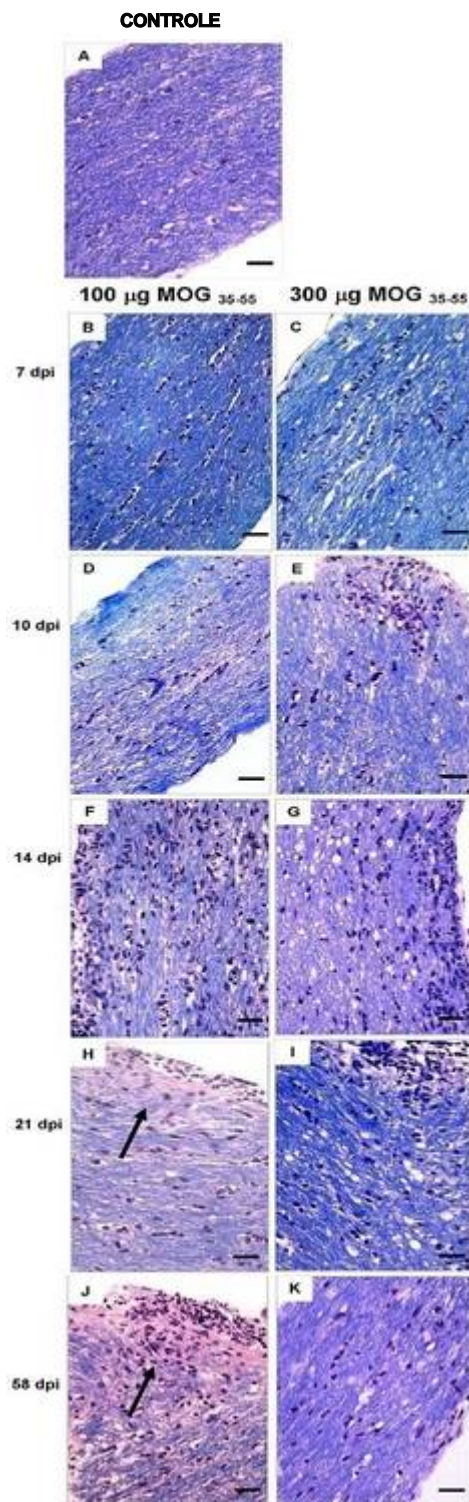


Figura 8 Nervos ópticos de camundongos C57BL/6 imunizados com 100 µg ou 300 µg do peptídeo glicoproteína dos oligodendrócitos da mielina (MOG₃₅₋₅₅) e do grupo controle. As figuras são representativas da análise histoquímica de nervos ópticos de camundongos nos dias 7, 10, 14, 21 e 58 pós-imunização (dpi) com 100 µg MOG₃₅₋₅₅ (B, D, F, H, J) ou 300 µg MOG₃₅₋₅₅ (C, E, G, I, K) e do grupo controle (A). As secções dos nervos ópticos foram coradas com *Luxol Fast Blue* e capturadas com aumento de 400x, barra de escala = 20 µm. Seta = sítio de desmielinização.

5.2.2.3 Avaliação do Perfil CD4 e CD8 por Imuno-histoquímica

A avaliação imuno-histoquímica de células marcadas com anticorpos anti-CD4 e anti-CD8 no nervo óptico mostrou ausência desses marcadores no grupo controle (Figura 9A,B).

No dia 7 pós-imunização, a avaliação imuno-histoquímica dos marcadores CD4 e CD8 no nervo óptico mostrou ausência desses marcadores em ambos os grupos imunizados. No dia 10 pós-imunização, observaram-se células CD4⁺ e CD8⁺ no infiltrado inflamatório apenas no grupo 300 µg MOG₃₅₋₅₅. No dia 14 pós-imunização, observaram-se células expressando CD4 e CD8 no infiltrado inflamatório em ambos os grupos imunizados (Figura 9C-F), mas de forma mais intensa no grupo 100 µg MOG₃₅₋₅₅ (Figura 9C,D). Após esse ponto, observou-se redução de células CD4⁺ e CD8⁺ no infiltrado inflamatório em ambos os grupos imunizados.

A avaliação morfométrica de células CD4⁺ e CD8⁺ no nervo óptico no dia 14 pós-imunização mostrou três vezes mais células CD4⁺ e CD8⁺ no grupo 100 µg MOG₃₅₋₅₅ em relação ao grupo 300 µg MOG₃₅₋₅₅ (Figura 10).

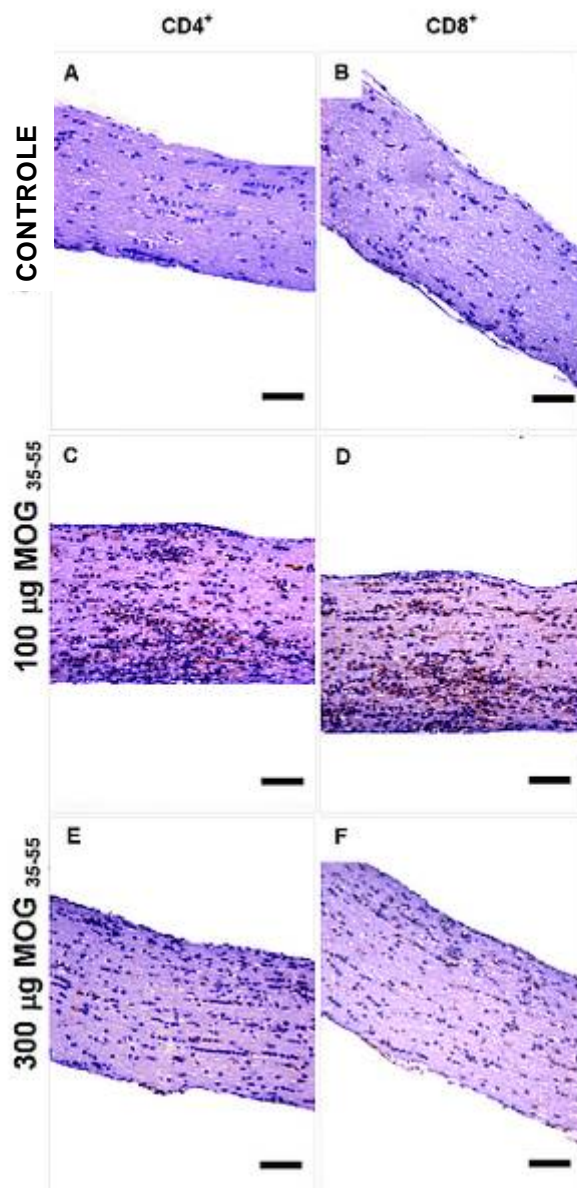


Figura 9 Detecção imuno-histoquímica de CD4 e CD8 no nervo óptico de camundongos C57BL/6 imunizados com 100 µg ou 300 µg do peptídeo glicoproteína dos oligodendrócitos da mielina (MOG₃₅₋₅₅) e do grupo controle. As figuras são representativas da detecção imuno-histoquímica de CD4 (A, C, E) e CD8 (B, D, F) dos camundongos no dia 14 pós-imunização com 100 µg MOG₃₅₋₅₅ (C, D) ou 300 µg MOG₃₅₋₅₅ (E, F). Magnificação de 200x, barra de escala=50 µm.

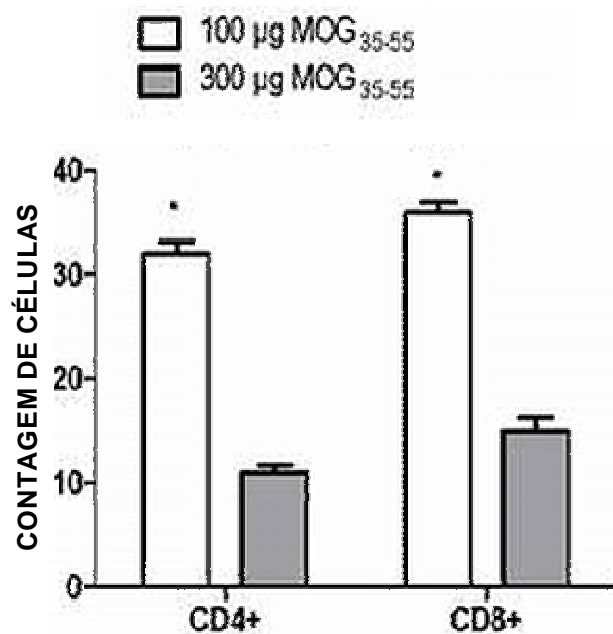


Figura 10 Avaliação morfométrica da imuno-histoquímica de CD4 e CD8 no nervo óptico de camundongos C57BL/6 imunizados com 100 µg ou 300 µg do peptídeo glicoproteína dos oligodendrócitos da mielina (MOG₃₅₋₅₅) no dia 14 pós-imunização. As barras representam a média ± erro padrão. * p < 0,05.

5.3 Frequência de Manifestações Clínicas de EAE e de Infiltrado Inflamatório no Nervo Óptico

No dia 7 pós-imunização nenhum animal apresentou manifestação clínica de EAE ou infiltrado celular inflamatório nos nervos ópticos. No dia 10 pós-imunização a EAE se manifestou clinicamente em 25% dos animais do grupo 100 µg MOG₃₅₋₅₅ e em 12,5% dos animais do grupo 300 µg MOG₃₅₋₅₅, ao passo que o infiltrado celular inflamatório no nervo óptico não ocorreu em nenhum animal do grupo 100 µg MOG₃₅₋₅₅ e ocorreu em 100% dos animais do grupo 300 µg MOG₃₅₋₅₅. No dia 14 pós-imunização tanto as manifestações clínicas de EAE quanto o infiltrado celular inflamatório dos nervos ópticos ocorreram em 100% dos animais de ambos os grupos imunizados. No dia 21 pós-imunização a EAE se manifestou clinicamente em 100% dos animais de ambos os grupos imunizados, ao passo que o infiltrado celular inflamatório do nervo óptico ocorreu em 100% do grupo 100 µg MOG₃₅₋₅₅ e em 75% dos animais do grupo 300 µg MOG₃₅₋₅₅. No dia 58 pós-imunização, a EAE permaneceu manifestando-se clinicamente em 100% dos animais de ambos os grupos imunizados, ao passo que o infiltrado celular inflamatório no nervo óptico ocorreu em 37,5% do grupo 100 µg MOG₃₅₋₅₅ e em 75% dos animais do grupo 300 µg MOG₃₅₋₅₅. A frequência de manifestações clínicas da EAE e de infiltrado inflamatório no nervo óptico em camundongos C57BL/6 imunizados com 100 µg ou 300 µg do peptídeo glicoproteína dos oligodendrócitos da mielina (MOG₃₅₋₅₅) é mostrada na Tabela 6.

Tabela 6 Frequência de manifestação clínica de Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE) e de infiltrado inflamatório no nervo óptico em camundongos C57BL/6 imunizados com 100 µg ou 300 µg do peptídeo glicoproteína dos oligodendrócitos da mielina (MOG₃₅₋₅₅).

Dias pós- imunização	100 µg MOG ₃₅₋₅₅		300 µg MOG ₃₅₋₅₅	
	Manifestações clínicas de EAE	Infiltrado inflamatório no nervo óptico	Manifestações clínicas de EAE	Infiltrado inflamatório no nervo óptico
7	0/8	0/8	0/8	0/8
10	2/8	0/8	1/8	8/8
14	8/8	8/8	8/8	8/8
21	8/8	8/8	8/8	6/8
58	8/8	3/8	8/8	6/8

5.4 Escore Clínico da EAE e Escore de Infiltrado Inflamatório no Nervo Óptico

O escore clínico da EAE nos dias em que os nervos ópticos foram avaliados e o escore de infiltrado inflamatório no nervo óptico em camundongos C57BL/6 imunizados com 100 µg ou 300 µg de MOG₃₅₋₅₅ são demonstrados na Figura 11.

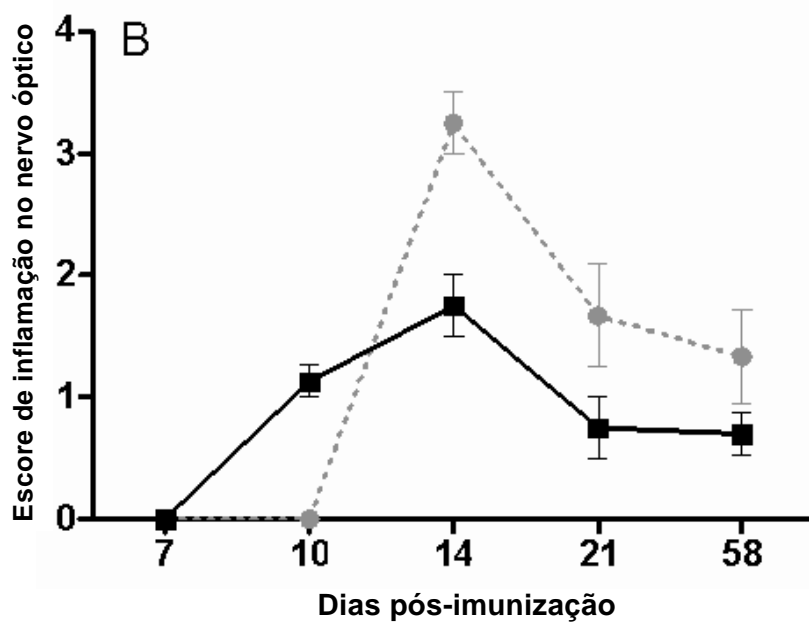
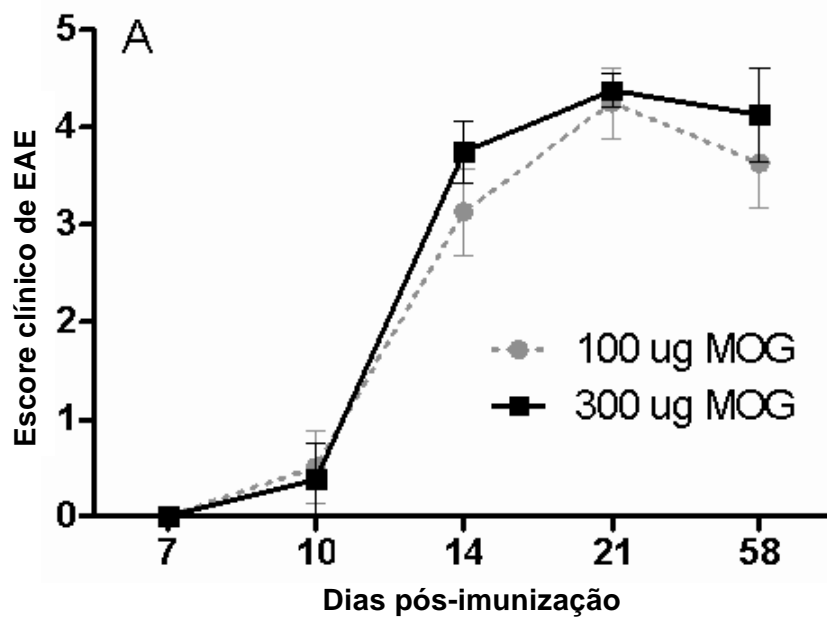


Figura 11 Escore clínico de Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE) nos dias em que os nervos ópticos foram avaliados (A) e escore de infiltrado inflamatório no nervo óptico (B) em camundongos C57BL/6 imunizados com 100 µg ou 300 µg do peptídeo glicoproteína dos oligodendrócitos da mielina (MOG₃₅₋₅₅). Cada ponto representa a média ± erro padrão (n=8 por grupo).

5.5 Quantificação da Quimiocina CCL5 no Nervo Óptico por ELISA

A produção da quimiocina CCL5 avaliada por meio de ELISA no dia 10 pós-imunização mostrou maior produção de CCL5 no grupo 300 µg MOG₃₅₋₅₅, em comparação com o grupo 100 µg MOG₃₅₋₅₅ e com o grupo controle (Figura 12).

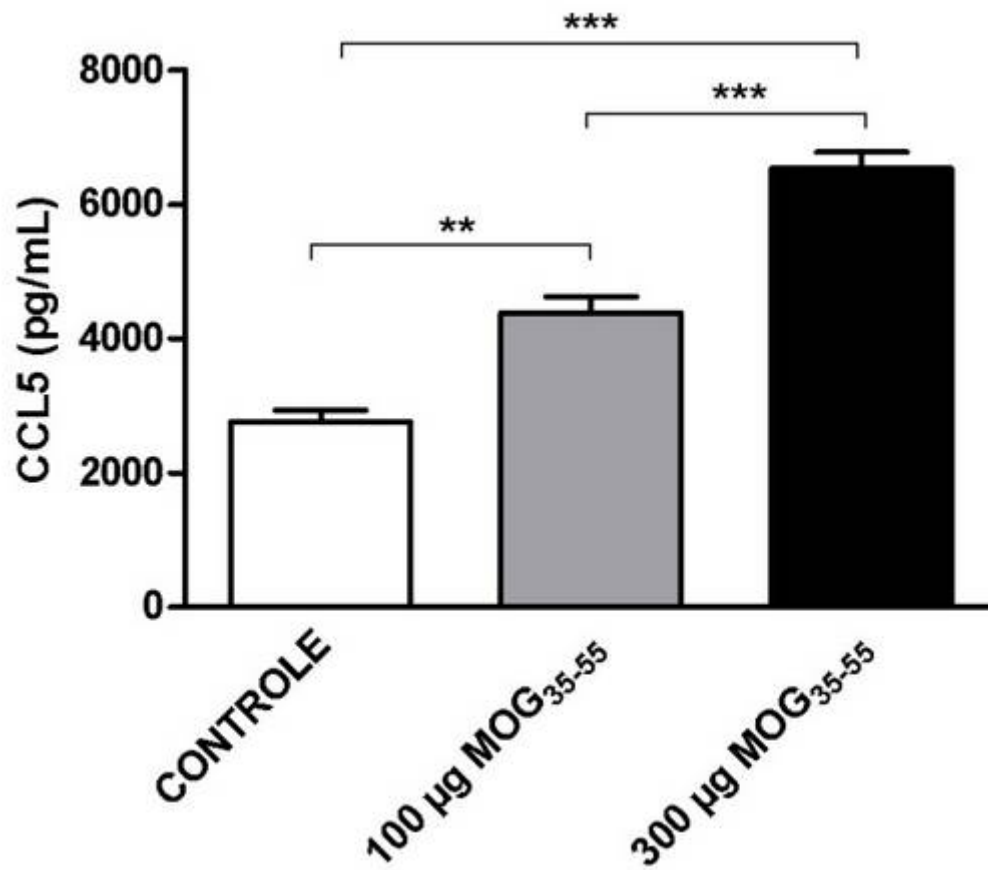


Figura 12 Produção da quimiocina CCL5 nos nervos ópticos de camundongos C57BL/6, no dia 10 pós-imunização, nos seguintes grupos: (i) controle, (ii) 100 µg MOG₃₅₋₅₅, (iii) 300 µg MOG₃₅₋₅₅. As barras representam a média ± erro padrão (n = 8). ** p < 0,01. *** p < 0,001.

6 DISCUSSÃO

A EAE é o modelo caracterizado tanto pela inflamação com o envolvimento de células mononucleares, quanto pela desmielinização, características que se assemelham às da EM (SOSPEDRA, MARTIN, 2005; YANOFF, SASSANI, 2009). É o modelo mais utilizado no estudo da neurite óptica, permitindo um melhor entendimento da fisiopatologia dessa doença, sendo também relevante na avaliação da eficácia e dos mecanismos de ação de novas drogas para seu tratamento. A linhagem de camundongos C57BL/6 tem sido bastante útil na indução de neurite óptica em EAE, especialmente quando se utiliza a MOG (SHAO *et al.*, 2004; GUO *et al.*, 2009; TIAN *et al.*, 2010; GUO *et al.*, 2011; QUINN *et al.*, 2011; CHAUDHARY *et al.*, 2011; MATSUDA *et al.*, 2012).

O presente trabalho demonstrou, claramente, que, na linhagem de camundongos C57BL/6, a neurite óptica se desenvolveu como resultado da imunização com MOG₃₅₋₅₅. Observou-se que os protocolos de indução utilizados reproduziram, de forma consistente, um processo inflamatório neural, ou seja, a neurite óptica. Demonstrou-se que esse é um modelo animal reprodutível, sendo avaliada, através do infiltrado celular inflamatório nos nervos ópticos e da quimiocina CCL5, a relação entre EAE e neurite óptica. O exame histopatológico do nervo óptico mostrou aumento da celularidade difusa ou focal, acompanhado por inflamação sub-pial e endoneural, associada a áreas de desmielinização, assemelhando-se aos achados da neurite óptica associada à EM em humanos.

O processo de desmielinização dos nervos ópticos e do sistema nervoso central é característico da EM e da EAE, tendo por resultado o dano axonal, levando à deterioração dos neurônios (BITSCH *et al.*, 2000; DUTRA *et al.*, 2011). A infiltração de linfócitos T CD4⁺ auto-reativos contra mielina tem sido considerada um dos principais responsáveis pelos danos observados na EM e na EAE (FLETCHER *et al.*, 2010). No presente estudo foi observado um intenso infiltrado inflamatório com quantidades elevadas de células CD4⁺ e CD8⁺ no grupo 100 µg MOG₃₅₋₅₅ no dia 14 pós-imunização, o que poderia sugerir uma correlação com o processo de desmielinização intenso do nervo óptico observado nos dias 21 e 58 pós-imunização desse grupo.

A MOG tem sido objeto de estudos que apoiam a possibilidade de que esse seja o antígeno-alvo primário no desenvolvimento da EM, mesmo sendo muito menos abundante do que a PBM (ADELMANN *et al.*, 1995; SOSPEDRA, MARTIN, 2005). Apesar de a EAE poder ser induzida por várias proteínas de mielina, sua indução com MOG provoca lesões principalmente no nervo óptico, o que pode ser explicado pela maior expressão de MOG no nervo óptico em relação à medula espinhal e pela localização de MOG na superfície mais externa da bainha de mielina do nervo óptico (BETTELLI *et al.*, 2003). Talvez seja essa maior exposição da MOG que faça com que a neurite óptica seja uma das primeiras manifestações clínicas na EM – aproximadamente de 15% a 20% dos pacientes a apresenta como primeira manifestação clínica da doença (KANSKI, 2007), e entre 30% e 60% dos pacientes a apresentam como uma manifestação clínica precoce (SODERSTROM *et al.*, 1998). Shao e colaboradores (2004) demonstraram que a neurite óptica pode preceder os sinais clínicos da EAE. O presente estudo demonstrou pico precoce da neurite óptica quando relacionada com as manifestações clínicas de EAE.

Sabe-se, também, que as diferentes formas clínicas da EM podem ser explicadas pelos graus de inflamação, desmielinização, remielinização e neurodegeneração (PETERSON, ROBERT, FUJINAMI, 2007). O presente trabalho é o primeiro que avalia a neurite óptica na EAE induzida por duas diferentes concentrações de MOG₃₅₋₅₅ (100 µg e 300 µg) nos dias 7, 10, 14, 21 e 58 pós-imunização. Os sinais clínicos de EAE não foram diferentes entre os grupos, no entanto formas distintas de evolução da neurite óptica foram observadas.

Os resultados do presente estudo mostraram progressão do estado inflamatório e gravidade distinta no nervo óptico em ambos os grupos, com um pico de inflamação no dia 14 pós-imunização. É importante observar que, embora o início da neurite óptica tenha sido mais tardia no grupo 100 µg de MOG₃₅₋₅₅, em relação ao grupo 300 µg de MOG₃₅₋₅₅, a gravidade da neurite óptica foi maior no grupo 100 µg de MOG₃₅₋₅₅ no dia de pico de inflamação do nervo óptico. Estudo comparando o desenvolvimento da neurite óptica em camundongos C57BL/6 imunizados com 50 µg ou 200 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅ mostrou início precoce da neurite óptica quando os camundongos foram imunizados com a maior concentração de MOG₃₅₋₅₅ (SHAO *et al.*, 2004). Tais resultados sugerem que o aumento da concentração de MOG poderia desenvolver neurite óptica mais precocemente, provavelmente devido à

localização da MOG na superfície mais externa da bainha de mielina do nervo óptico (BETTELLI *et al.*, 2003). Em contraste, no presente estudo, a concentração mais baixa de MOG₃₅₋₅₅ mostrou maior gravidade inflamatória. A diferença de achados entre este estudo e o de Shao poderia ser explicada pela concentração e pelo momento da injeção de toxina *pertussis*. Enquanto Shao e colaboradores (2004) utilizaram uma elevada concentração dessa toxina (400 ng), injectada no dia anterior e 24 horas após a indução da EAE, no presente estudo uma menor concentração de toxina *pertussis* (300 ng) foi utilizada, sendo injectada no dia e 48 horas após a indução da EAE. Portanto, o tempo de aplicação e a concentração da toxina *pertussis* parecem influenciar diretamente a apresentação de antígenos e a resposta imune (BAGLEY *et al.*, 2002; HOU *et al.*, 2003). Além disso, alguns autores demonstraram que a eficácia da apresentação de antígeno pode ser consequência das doses crescentes de adjuvantes utilizados (BILLIAU, MATTHYS, 2001; CHEN *et al.*, 2006; KAI *et al.*, 2006; BERARD *et al.*, 2010).

A EAE pode seguir um curso remitente-recorrente ou crônico, com características que poderiam se aproximar da forma remitente-recorrente e das formas progressivas da EM. Entretanto, os modelos experimentais utilizam animais de linhagens genéticas distintas ou diferentes antígenos e concentrações para a indução, o que dificulta a comparação e compreensão dos mecanismos moleculares responsáveis pela diferença entre essas duas formas de evolução clínica da doença. Neste estudo, objetivou-se avaliar a importância da concentração antigênica utilizada no momento da indução para o desenvolvimento clínico da EAE e de neurite óptica. Utilizaram-se dois protocolos distintos de indução em camundongos da linhagem C57BL/6, fazendo-se uso do mesmo antígeno de mielina em duas concentrações diferentes (100 µg ou 300 µg de peptídeo MOG₃₅₋₅₅) e mantendo-se as concentrações de *Mycobacterium tuberculosis* (4 mg/mL) e toxina *pertussis* (300 ng) constantes.

Corroborando com os resultados aqui apresentados, Shao e colaboradores (2004) também não encontraram diferenças em relação ao escore clínico da EAE entre os grupos de animais imunizados com 50 µg ou 200 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅, mantendo constantes as concentrações de *Mycobacterium tuberculosis* (600 µg/mL) e toxina *pertussis* (400 ng). Diferentemente, Berard e colaboradores (2010), ao induzirem a EAE em camundongos da linhagem C57BL/6 através da utilização do

antígeno MOG₃₅₋₅₅ em duas concentrações diferentes (50 µg ou 300 µg do peptídeo MOG₃₅₋₅₅), variando-se também as concentrações de *M. tuberculosis* (1 mg/mL ou 4 mg/mL) e de toxina *pertussis* (200 ng ou 300 ng), encontraram diferenças em relação à pontuação do escore clínico da EAE entre os grupos de animais imunizados. Embora esses autores tenham demonstrado que a utilização de concentrações elevadas de MOG possa induzir a EAE mais grave, os resultados clínicos do presente estudo não foram alterados com a utilização de 300 µg de MOG₃₅₋₅₅ (BERARD *et al.*, 2010). Outro estudo demonstrou que as células apresentadoras ativas não foram geradas após o aumento de concentração de MOG (WU *et al.*, 2011).

Em recente trabalho, o nervo óptico foi avaliado histologicamente quanto à presença de infiltrado inflamotório por H&E. Foram utilizadas fêmeas de camundongos da linhagem C57BL/6, com idade entre 6 e 7 semanas, sendo a imunização realizada com injeção subcutânea de 150 µg de MOG₃₅₋₅₅ e adjuvante completo de Freund suplementado com 2,5 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis*, além de 200 ng de toxina *pertussis* injetada por via intra-peritoneal nos dias 0 e 2 pós-imunização. Os camundongos foram sacrificados nos dias 15, 25, 35, 40 ou 50 pós-imunização. A neurite óptica foi detectada em mais de 80% dos nervos ópticos nos dias 15 e 25 pós-imunização e em mais de 60% dos nervos ópticos no dia 50 pós-imunização. (QUINN *et al.*, 2011). No presente trabalho, no dia 7 pós-imunização, nenhum animal apresentou neurite óptica; no dia 10 pós-imunização, a neurite óptica não ocorreu em nenhum animal do grupo 100 µg MOG₃₅₋₅₅ e ocorreu em 100% dos animais do grupo 300 µg MOG₃₅₋₅₅; no dia 14 pós-imunização, a neurite óptica ocorreu em 100% dos animais de ambos os grupos imunizados; no dia 21 pós-imunização, a neurite óptica ocorreu em 100% do grupo 100 µg MOG₃₅₋₅₅ e em 75% dos animais do grupo 300 µg MOG₃₅₋₅₅; no dia 58 pós-imunização, a neurite óptica ocorreu em 37,5% do grupo 100 µg MOG₃₅₋₅₅ e em 75% dos animais do grupo 300 µg MOG₃₅₋₅₅.

O processo pelo qual se formam as lesões na EM é complexo e inclui múltiplos fatores da resposta imunológica, entre eles citocinas, quimiocinas e imunoglobulinas. A infiltração de leucócitos contribui para a patogênese da inflamação autoimune no sistema nervoso central, ocorrendo não só na EM, mas também na EAE. Supõe-se que o recrutamento de leucócitos e sua ativação no SNC

resultem nos sintomas e na progressão da doença. A CCL5 é uma quimiocina envolvida no influxo de leucócitos para o SNC em EAE. Além disso, o tratamento com anticorpo anti-CCL5 impediu a adesão de leucócitos na microvasculatura cerebral em modelo de EAE (RODRIGUES *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2005). No presente trabalho, a produção da quimiocina CCL5 foi avaliada no dia 10 pós-imunização, dia em que ocorreu, pela primeira vez, infiltrado inflamatório no nervo óptico. A concentração mais elevada de CCL5 observada nos nervos ópticos do grupo 300 µg de MOG₃₅₋₅₅, em comparação com o grupo 100 µg de MOG₃₅₋₅₅, pode explicar o início precoce do infiltrado celular inflamatório no grupo 300 µg de MOG₃₅₋₅₅ no dia 10 pós-imunização - todos os animais desse grupo apresentaram neurite óptica, porém esta não ocorreu em nenhum animal do grupo 100 µg de MOG₃₅₋₅₅.

Alguns estudos avaliaram determinados fármacos no tratamento da neurite óptica em EAE. Em cada um deles foi utilizada uma dose de MOG₃₅₋₅₅ na indução da EAE e os nervos ópticos foram avaliados em determinado dia de eutanásia dos animais. Guo e colaboradores (2009) avaliaram o efeito da geranilgeranilacetona sobre a neurite óptica no dia 22 pós-imunização, utilizando 100 µg de MOG₃₅₋₅₅ na indução da EAE. Guo e colaboradores (2011) avaliaram o efeito da espermidina sobre a neurite óptica no dia 25 pós-imunização, sendo a EAE induzida com 100 µg de MOG₃₅₋₅₅. Chaudhary e colaboradores (2011) demonstraram o efeito do ácido lipoico sobre a neurite óptica nos dias 21 e 24 pós-imunização, utilizando 200 µg de MOG₃₅₋₅₅ na indução da EAE. Matsuda e colaboradores (2012) demonstraram a eficácia da terapia gênica com peptídeo relacionado ao gene calcitonina (CGRP) na prevenção de neurite óptica no dia 14 pós-imunização, utilizando 200 µg de MOG₃₅₋₅₅ na indução da EAE. No presente estudo, demonstrou-se que o pico da neurite óptica ocorreu no dia 14 pós-imunização em ambos os grupos estudados, sendo mais intenso no grupo imunizado com 100 µg de MOG₃₅₋₅₅. Dessa forma, é possível sugerir a dose de 100 µg de MOG₃₅₋₅₅ e o dia 14 pós-imunização como ideais para a avaliação da neurite óptica em camundongos da linhagem C57BL/6, bem como para verificar a real eficácia de um fármaco em estudo no tratamento da neurite óptica no modelo de EAE.

O estudo e a comparação de diferentes protocolos de indução de modelos experimentais da EM podem favorecer uma melhor compreensão do complexo processo inflamatório gerado no SNC durante a doença, o que pode auxiliar no

desenvolvimento de novas terapias para a EM. No presente estudo observou-se que o início da neurite óptica no grupo 300 µg de MOG₃₅₋₅₅ coincidiu com a maior produção de CCL5, no dia 10 após a indução de EAE. No entanto, o grupo 100 µg de MOG₃₅₋₅₅ mostrou neurite óptica mais intensa no dia 14 pós-imunização, com valores mais elevados de células expressando CD4 e CD8, alcançando um processo de desmielinização intenso nos dias 21 e 58 pós-imunização. Os resultados do presente estudo contribuem para o entendimento da neurite óptica na EAE, já que foram demonstradas duas diferentes formas de evolução da neurite óptica por meio da utilização de duas diferentes concentrações de um mesmo peptídeo na indução desse modelo animal que reflete aspectos específicos da EM.

7 CONCLUSÃO

- A variação somente na concentração do antígeno MOG₃₅₋₅₅ não foi capaz de induzir formas clínicas diferentes neste modelo de EAE;
- A variação somente na concentração do antígeno MOG₃₅₋₅₅ foi capaz de influenciar parâmetros morfológicos e imunológicos envolvidos na cinética da neurite óptica neste modelo animal de EAE;
- A avaliação histopatológica e imuno-histoquímica do nervo óptico mostrou aumento da celularidade difusa ou focal, sendo demonstrada a presença de células CD4⁺ e CD8⁺, com inflamação sub-pial e endoneural, associada a áreas de desmielinização;
- A concentração mais elevada de CCL5 observada nos nervos ópticos do grupo 300 µg de MOG₃₅₋₅₅, em comparação com o grupo 100 µg de MOG₃₅₋₅₅, pode explicar o início precoce do infiltrado celular inflamatório no grupo 300 µg de MOG₃₅₋₅₅.

Os resultados do presente estudo contribuem para a compreensão da evolução da neurite óptica no modelo animal de EAE, já que variações na concentração de MOG₃₅₋₅₅ foram capazes de induzir diferentes perfis de neurite óptica neste modelo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU ZEID, N.; BHATTI, M.T. Acute inflammatory demyelinating optic neuritis: evidence-based visual and neurological considerations. **The Neurologist**, v.14, n.4, p.207–223, Jul. 2008.

ADAMUS, G.; BROWN, L.; ANDREW, S.; MEZA-ROMERO, R.; BURROW, G.G.; VANDENBARK, A.A. Neuroprotective effects of recombinant T-cell receptor ligand in autoimmune optic neuritis in HLA-DR2 mice. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, manuscript 11-8419, Dec. 2011.

ADELMANN, M.; WOOD, J.; BENZEL, I.; FIORI, P.; LASSMANN, H.; MATTHIEU, J.M.; GARDINIER, M.V.; DORNMAIR, K.; LININGTON, C. The N-terminal domain of the myelin oligodendrocyte (MOG) induces acute demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis in the Lewis rat. **The Journal of Neuroimmunology**, v.63, p.17-27, 1995.

ANDERSON, A.C.; CHANDWASKAR, R.; LEE, D.H.; SULLIVAN, J.M.; SALOMOM, A.; RODRIGUEZ-MANZANET, R.; GREVE, B.; SOBEL, R.A.; KUCHROO, V.K. A transgenic model of central nervous system autoimmunity mediated by CD4 + and CD8+ T and B cells. **The Journal of Immunology**, v.188, p.2084-2092, Jan. 2012.

BAGLEY, K.C.; ABDELWAHAB, S.F.; TUSKAN, R.G.; FOUTS, T.R.; LEWIS, G.K. Pertussis toxin and the adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis* activate human monocytederived dendritic cells and dominantly inhibit cytokine production through a cAMP-dependent pathway. **Journal of Leukocyte Biology**, v.72, p. 962–969, Nov. 2002

BALASHOV, K. E.; ROTTMAN, J. B.; WEINER, H. L.; HANCOCK W. W. CCR5_ and CXCR3_ T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1_ and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. **Proceedings of National Academy of Science of United State of America**, v.96, p.6873-6878, Jun. 1999.

BECK, R. W.; TROBE, J.D.; MOKE, P.S.; GAL, R.L.; XING, D.; BHATTI, M.T.; BRODSKY, M.C.; BUCKLEY, E.G.; CHROUSOS,G.A.; CORBETT, J.; EGGENBERGER, E.; GOODWIN, J.A.; KATZ, B.; KAUFMAN, D.I.; KELTNER, J.L.; KUPERSMITH, M.J.; MILLER, N.R.; NAZARIAN, S.; ORENGO-NANIA, S.; SAVINO, P.J.; SHULTS, W.T.; SMITH, C.H.; WALL, M. High- and low-risk profiles for the development of multiple sclerosis within 10 years after optic neuritis: experience of the optic neuritis treatment Trial. **Archives of Ophthalmology**, v.121, p.944-949, Jul. 2003.

BELMADANI, A.; TRAN, P.B.; REN, D.; MILLER, R.J. Chemokines Regulate the Migration of Neural Progenitors to Sites of Neuroinflammation. **The Journal of Neuroscience**,v.26, n.12, p.3182-3191, 2006.

BERARD, J.L.; KERR, B.J.; JOHNSON, H.M.; DAVID, S. Differential expression of SOCS1 in macrophages in relapsing-remitting and chronic EAE and its role in disease severity. **Glia**, v.58, p.1816-1826, Nov. 2010.

BERARD, J.L.; WOLAK, K.; FOURNIER, S.; DAVID, S. Characterization of relapsing-remitting and chronic forms of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. **Glia**, v.58, n.4, p.434-445, Mar. 2010.

BERGER, T.; WEERTH, S.; KOJIMA,K.; LININGTON, C.; WEKERLE, H.; LASSMANN, H. Experimental autoimmune encephalomyelitis: the antigen specificity of T lymphocytes determines the topography of lesions in the central and peripheral nervous system. **Laboratory Investigation**, v. 76, n.3, p.355-364, Mar. 1997.

BETTELLI, E.; BAETEN, D.; JÄGER, A.; SOBEL, R.A.; KUCHROO, V.K. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T and B cells cooperate to induce a Devic-like disease in mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n.9, p.2393-2402, Sep. 2006.

BETTELLI, E.; PAGANY, M.; WEINER, H.L.; LININGTON, C.; SOBEL, R.A.; KUCHROO, V.K. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis. **The Journal of Experimental Medicine**, v.197, n.9, p.1073-1081, May. 2003.

BILLIAU, A.; MATTHYS, P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. **Journal of Leukocyte Biology**, v.70, p. 849-860, Dec. 2001.

BITSCH, A.; SCHUCHARDT, J.; BUNKOWSKI, S.; KUHLMANN, T.; BRÜCK, W. Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. **Brain**, v.123, p.1174-1183, Jun. 2000.

BOVEN, L. A.; MONTAGNE, L.; NOTTET, H. S.; DE GROOT, C. J. Macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1 alpha), MIP-1 beta, and RANTES mRNA semiquantification and protein expression in active demyelinating multiple sclerosis (MS) lesions. **Clinical and Experimental Immunology**. v.122, n.2, p.257-263, Nov. 2000.

CHAUDHARY, P.; MARRACCI, G.; YU, X.; GALIPEAU, D.; MORRIS, B.; BOURDETTE, D. Lipoic acid decreases inflammation and confers neuroprotection in experimental autoimmune optic neuritis. **The Journal of Neurology**, v.233, n.1-2, p.90-96, Apr. 2011.

CHEN, X.; WINKLER-PICKETT, R.T.; CARBONETTI, N.H.; ORLANDO, J.R.; OPPENHEIM, J.J.; HOWARD, O.M. Pertussis toxin as an adjuvant suppresses the number and function of CD4+CD25+ T regulatory cells. **European Journal of Immunology**, v.36, p.671-680, Mar. 2006.

COMPSTON, A.; COLES, A. Multiple sclerosis. **The Lancet**, v.372, p.1502-1517, Oct. 2008

DENG, X.; SRIRAM, S. Role of microglia in multiple sclerosis. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v.5, n.3, p.239-244, May. 2005.

DE PAULA, M.L.; RODRIGUES, D.H.; TEIXEIRA, H.C.; BARSANTE, M.M.; FERREIRA, A.P. Genistein down-modulates proinflammatory cytokines and reverses clinical signs of experimental autoimmune encephalomyelitis. **International Immunopharmacology**, v.8, n.9, p.1291-1297, Sep. 2008.

DUTTA, R.; CHANG, A.; DOUD, M.K.; KIDD, G.J.; RIBAUDO, M.V.; YOUNG, E.A.; FOX, R.J.; STAUGAITIS, S.M.; TRAPP, B.D. Demyelination causes synaptic alterations in hippocampi from multiple sclerosis patients. **Annals of Neurology**, v.69, p.445-454, Mar. 2011.

ENGELHARDT, B.; RANSOHOFF, R.M. The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. **Trends Immunology**, v.26, n.9, p. 485-495, 2005.

ERCOLINI, A.M.; MILLER, S.D. Mechanisms of immunopathology in murine models of central nervous system demyelinating disease. **Journal of Immunology**, v. 176, n. 6, p. 3293-3298, 2006.

FLETCHER, J.M.; LATOR, S.J.; SWEENEY, C.M.; TUBRIDY, N.; MILLS, K.H. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. **Clinical and Experimental Immunology**, v.162 p.1-11, Oct. 2010.

GLABINSKI, A.R.; BIELECKI, B.; O'BRYANT, S.; SELMAJ, K.; RANSOHOFF, R.M. Experimental autoimmune encephalomyelitis: CC chemokine receptor expression by trafficking cells. **Journal of Autoimmunity**, v.19, n.4, p.175-181, 2002.

GUO, X.; HARADA, C.; NAMEKATA, K.; KIKUSHIMA, K.; MITAMURA, Y.; YOSHIDA, H.; MATSUMOTO, Y.; HARADA, T. Effect of geranylgeranylacetone on optic neuritis in experimental autoimmune Encephalomyelitis. **Neuroscience Letters**, v.462, n.3, p.281–285, Feb. 2009.

GUO, X.; HARADA, C.; NAMEKATA, K.; KIMURA, A.; MITAMURA, Y.; YOSHIDA, H.; MATSUMOTO, Y.; HARADA, T. Spermidine alleviates severity of murine experimental autoimmune encephalomyelitis. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, manuscript 10-6015, Jan. 2011.

GUYTON, M.K.; SRIBNICK, E.A.; RAY, S.K.; BANIK, N.L. A role for calpain in optic neuritis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1053, p.48-54, Aug. 2005.

HOU, W.; WU, Y.; SUN, S.; SHI, M.; SUN, Y.; YANG, C.; PEI, G.; GU, Y.; ZHONG, C.; SUN, B. Pertussis toxin enhances Th1 responses by stimulation of dendritic cells. **Journal of Immunology**, v.170, p.1728-1736, Dec. 2003.

IMLER JR, T.J.; PETRO, T.M. Decreased severity of experimental autoimmune encephalomyelitis during resveratrol administration is associated with increased IL-17+IL-10+ T cells, CD4+ IFN- γ + cells, and decreased macrophage IL-6 expression. **International Immunopharmacology**, v.9, n.1, p.134-143, Jan. 2008.

JALOSINSKI, M.; KAROLCZAK, K.; MAZUREK, A.; GLABINSKI, A. The effects of methylprednisolone and mitoxantrone on CCL5-induced migration of lymphocytes in multiple sclerosis. **Acta Neurologica Scandinavica**, v.118, n.2, p.120-125, 2008.

KAI, H.; SHIBUYA, K.; WANG, T.; KAMETA, H.; KAMEYAMA, T.; TAHARA-HANAOKA, S.; MIYAMOTO, A.; HONDA, S.; MATSUMOTO, I.; KOYAMA, A.; SUMIDA, T.; SHIBUYA, A. Critical role of M. tuberculosis for dendritic cell maturation to induce collagen-induced arthritis in H-2b background of C57BL/6 mice. **Immunology**, v.118, p.233-239, Jun. 2006.

KANSKI, J.J. **Clinical Ophthalmology-A Systematic Approach**, 6th edition. Elsevier, 2007.

KEZUKA, T.; USUI, Y.; GOTO, H. Analysis of the Pathogenesis of Experimental Autoimmune Optic Neuritis. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v.2011, Article ID 294046, 5 pages, 2011.

KIVISÄKK, P.; MAHAD, D.J.; CALLAHAN, M.K.; TREBST, C.; TUCKY, B.; WEI, T.; WU, L.; BAEKKEVOLD, E.S.; LASSMANN, H.; STAUGAITIS, S.M.; CAMPBELL, J.J.; RANSOHOFF, R.M. Human cerebrospinal fluid central memory CD4+ T cells: evidence for trafficking through choroid plexus and meninges via P-selectin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.100, n.14, p. 8389-8394, 2003.

KIVISAKK, P.; TUCKY, B.; WEI, T.; CAMPBELL, J.J.; RANSOHOFF, R.M. Human cerebrospinal fluid contains CD4+ memory T cells expressing gut- or skin-specific trafficking determinants: relevance for immunotherapy. **BMC Immunology**, v.7, p.14, 2006.

KUERTEN, S.; KOSTOVA-BALES, D.A.; FRENZEL, L.P.; TIGNO, J.T.; TARY-LEHMANN, M.; ANGELOV, D.N.; LEHMANN, P.V. MP4- and MOG:35-55-induced EAE in C57BL/6 mice differentially targets brain, spinal cord and cerebellum. **Journal of Neuroimmunology**, v.189, p.31-40, Sep. 2007.

KRISHNAMOORTHY,G.; HOLZ, A.; WEKERLE, H. Experimental models of spontaneous autoimmune disease in the central nervous system. **Journal of Molecular Medicinal**, v.85, n.11, p.1161-1173, Nov. 2007.

KROENKE, M.A.; CARLSON, T.J.; ANDJELKOVIC, A.V.; SEGAL, B.M. IL-12 and IL-23-modulated T cells induce distinct types of EAE based on histology, CNS chemokine profile, and response to cytokine inhibition. **The Journal of Experimental Medicine**, v.205, n.7, p.1535-1541, Jun. 2008.

LAURENCE, A.; O'SHEA, J.J. TH17 differentiation: of mice and men. **Nature Immunology**, v.8, n.9, p.903-905, Sep. 2007.

LOUTEN, J.; BONIFACE, K.; MALEFYT, R.W. Development and function of TH17 cells in health and disease. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.123, n.5, p.1004-11, May. 2009.

LUBLIN, F.D. The incomplete nature of multiple sclerosis relapse resolution. **Journal of the Neurological Sciences**, v.256, S14-S18, May. 2007.

MAHAD, D.J.; TREBST, C.; KIVISAKK, P.; STAUGAITIS, S.M.; TUCKY, B.; WEI, T.; LUCCHINETTI, C.F.; LASSMANN, H.; RANSOHOFF, R.M. Expression of chemokine receptors CCR1 and CCR5 reflects differential activation of mononuclear phagocytes in pattern II and pattern III multiple sclerosis lesions. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v.63, n.3, p.262-273, 2004.

MARCONDES, M.C.; FURTADO, G.C.; WENSKY, A.; LAFAILLE, M. A. C.; FOX, H.S.; LAFAILLE, J.J. Immune regulatory mechanisms influence early pathology in spinal cord injury and in spontaneous autoimmune encephalomyelitis. **The American Journal of Pathology**, v.166, n.6, p.1749-1760, Jun. 2005.

MARTIN, R.; MCFARLAND, H.F.; MCFARLIND, D.E. Immunological aspects of demyelinating diseases. **Annual Review of Immunology**, v.10, p.153-187, 1992.

MATSUDA, R.; KEZUKA, T.; NISHIVAMA, C.; USUI, Y.; MATSUNAGA, Y.; OKUNUKI, Y.; YAMAKAWA, N.; OGAWA, H.; OKUMURA, K; GOTO, H. Suppression of murine experimental autoimmune optic neuritis by mature dendritic cells transfected with calcitonin gene-related Peptide gene. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.53, n.9, p. 5475-5485, Aug. 2012.

McQUIBBAN, G.A.; Gonq, J.H.; WONG, J.P.; WALLACE, J.L.; CLARK-LEWIS, I.; OVERALL, C.M. Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo. **Blood**, v.100, n.4, p.1160-1107, 2002.

MIOSSEC, P. Clinical implications of Th17/IL-17. Diseases that may benefit from manipulating the Th17 pathway. **European Journal of Immunology**, v.39, n.3, p.667-669, Mar. 2009.

MOWRY, E.M., BALCER, L.J.; GALETTA, S.L. Multiple sclerosis and the ophthalmologist. **Comprehensive Ophthalmology Update**, v.8, n.1, p.39-49, Jan-Feb. 2007.

NAIR, A.; FREDERICK, T.J.; MILLER, S.D. Astrocytes in multiple sclerosis: a product of their environment. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.65, n.17, p.2702-2720, Sep. 2008.

NESSLER, S.; BRÜCK, W. Advances in multiple sclerosis research in 2009. **The Journal of Neurology**, v.257, n.9, p.1590–1593, Sep. 2010.

OSBONE, B.J.; VOLPE, N.J. Optic neuritis and risk of MS: differential diagnosis and management. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v.76, n.3, p.181-190, Mar. 2009.

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

PETERSON, L.K.; ROBERT, S.; FUJINAMI, R.S. Inflammation, demyelination, neurodegeneration and neuroprotection in the pathogenesis of multiple sclerosis. **The Journal of Neuroimmunology**, v.184, n.1-2, p.37-44, Mar. 2007.

PICCIO, L.; ROSSI, B.; SCARPINI, E.; LAUDANNA, C.; GIAGULLI, C.; ISSEKUTZ, A.C.; VESTWEBER, D.; BUTCHER, E.C.; CONSTANTIN, G. Molecular mechanisms involved in lymphocyte recruitment in inflamed brain microvessels: critical roles for P-selectin glycoprotein ligand-1 and heterotrimeric Gi-linked receptors. **The Journal of immunology**, v.168, n.4, p.1940-1949, 2002.

POTTER, N.T.; BIGAZZI, P.E. Acute optic neuritis associated with immunization with the CNS myelin proteolipid protein. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.33, n.5, p.1717-1722, Apr. 1992.

QUINN, T.A.; DUTT, M.; SHINDLER, K.S. Optic neuritis and retinal ganglion cell loss in a chronic murine model of multiple sclerosis. **Frontiers of Neurology**, v.2, p.1-6, Aug 2011.

QUINTANA, F.J.; WEINER, H.L. Environmental control of Th17 differentiation. **European Journal of Immunology**, v.39, n.3, p.655-657, Mar. 2009.

REBOLDI, A.; CAROLINE COISNE, C.; DIRK BAUMJOHANN, D.; FEDERICA BENVENUTO, F.; BOTTINELLI, D.; LIRA, S.; UCCELLI, A.; LANZAVECCHIA, A.; BRITTA ENGELHARDT, B.; SALLUSTO, F. C-C chemokine receptor 6–regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. **Nature Immunology**, v.10, n.5, p.514-523, May. 2009.

RODRIGUES, D.H.; LACERDA-QUEIROZ, N.; MIRANDA, A.S.; FAGUNDES, C.T.; CAMPOS, R.D.; ARANTES, R.E.; VILELA, M.C.; RACHID, M.A.; TEIXEIRA, M.M.; TEIXEIRA, A.L. Absence of PAF receptor alters cellular infiltrate but not rolling and adhesion of leukocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Brain Research**, v.1385, p.298-306, Apr. 2011.

ROTTMAN, J.B.; SLAVIN, A.J.; SILVA, R.; WEINER, H.L.; GERARD, C.G.; HANCOCK, W.W. Leukocyte recruitment during onset of experimental allergencephalomyelitis is CCR1 dependent. **European Journal of Immunology**, v.30, n.8, p. 2372-2377, 2000.

SANTOS, A. C.; BARSANTE, M. M.; ARANTES, R.M.E.; BERNARD, C.C.A.; TEIXEIRA, M.; CARVALHO-TAVARES, J. CCL2 and CCL5 mediate leukocyte adhesion in experimental autoimmune encephalomyelitis – an intravital microscopy study. **Journal of Neuroimmunology**, v.162, n.1-2, p.122-129, May. 2005.

SHAMS, P. N.; PLANT, G. T. Optic neuritis: a review. **International MS Journal**, v.16, n.3, p.82-89, Sep.2009.

SHAO, H.; HUANG, Z.; SUN, S.L.; KAPLAN, H.J.; SUN, D. Myelin/oligodendrocyte glycoprotein-specific T-cells induce severe optic neuritis in the C57B1/6 mouse. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 45, n.11, p.4060-4065, Nov. 2004.

SHI, Y.; FENG, Y.; KANG, J.; LIU, C.; LI, Z.; LI, D.; CAO, W.; QIU, J.; GUO, Z.; BI, E.; ZANG, L.; LU,C.; ZHANG, J.Z.; PEI, G. Critical regulation of CD4+ T cell survival and autoimmunity by β -barrestin 1. **Nature Immunology**, v.8, n.8, p.817-824, Aug. 2007.

SHINDLER, K. S.; GUAN, Y.; VENTURA, E.; BENNETT, J.; ROSTAMI, A. Retinal ganglion cell loss induced by acute optic neuritis in a relapsing model of multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis**, v.12, n.5, p.526-532, Oct. 2006.

SORENSEN, T. L.; TANI, M.; JENSEN, J.; PIERCE, V.; LUCCHINETTI, C.; FOLCIK, V. A; QIN, S.; ROTTMAN, J.; SELLEBJERG, F.; STRIETER, R. M.; FREDERIKSEN, J. L.; RANSOHOFF, R. M. Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. **The Journal of Clinical Investigation**, v.103, n.6, p.807-815, 1999.

SOSPEDRA, M.; MARTIN, R. Immunology of Multiple Sclerosis. **Annual Review of Immunology**, v.23, p.683-747, 2005.

STORCH, M.K.; STEFFERL, A.; BREHM, U.; WEISSERT, R.; WALLSTRÖM, E.; KERSCHENSTEINER, M.; OLSSON, T.; LININGTON, C.; LASSMANN, H. Autoimmunity to myelin oligodendrocyte glycoprotein in rats mimics the spectrum of multiple sclerosis pathology. **Brain Pathology**, v.8, n.4, p.681-694, Oct. 1998.

TELESHOVA, N.; PASHENKOV M.; HUANG Y. M.; SÖDERSTRÖM M.; KIVISÄKK P.; KOSTULAS V.; HAGLUND M.; LINK, H. Multiple sclerosis and optic neuritis: CCR5 and CXCR3 expressing T cells are augmented in blood and cerebrospinal fluid. **Journal of Neurology**, v.249, p.723-729, Jun. 2002.

TIAN, A-Y.; ZHANG, R-W.; SHI,X-G.; YU,H-M. Alteration of T helper cell subsets in the optic nerve of experimental autoimmune encephalomyelitis. **International Journal of Molecular Medicine**, v.25, p.869-874, 2010 .

TRAPP, B.D.; PETERSON, J.; RANSOHOFF, R.M.; RUDICK, R.; MÖRK, S.; BÖ, L. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. **The New England Journal of Medicine**, v.338, n.5, p.278-285, Jan. 1998.

WALLIN, M.Y.; PAGE, W.F.; KURTKEE, J.F. Multiple sclerosis in US veterans of the Vietnam era and later military service: race, sex, and geography. **Annals of Neurology**, v.55, n.1, p.65-71, Jan. 2004.

WEINSHENKER, B.G.; BASS, B.; RICE, G.P.A.; NOSEWORTHY, J.; CARRIERE, W.; BASKERVILLE. J.; EBERS. G.C. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. 2. Predictive value of the early clinical course. **Brain**, v.112, p.1419-1428, Dec. 1989.

WENSKY, A.K.; FURTADO, G.C.; MARCONDES, M.C.G.; CHEN, S.; MANFRA, D.; LIRA, S. A.; ZAGZAG, D.; LAFAILLE, J.J. IFN- γ determines distinct clinical outcomes in autoimmune encephalomyelitis. **The Journal of Immunology**, v.174, n.3, p.1416-1423, Feb. 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Atlas Multiple Sclerosis Resources in the World 2008**. World Health Organization, p. 1-54, 2008.

WU, G.F., SHINDLER, K.S., ALLENSPACH, E.J., STEPHEN, T.L., THOMAS, H.L., MIKESELL, R.J., CROSS, A.H., LAUFER, T.M. Limited sufficiency of antigen presentation by dendritic cells in models of central nervous system autoimmunity. **Journal of Autoimmunity**, v.36, p.56-64, Feb. 2011.

YANOFF, M.; SASSANI, J. W. **Ocular Pathology**, 6th edition. Mosby, 2009.

YIN, J.X; TU, J.L.; LIN, H.J.; SHI, F.D.; LIU, R.L.; ZHAO, C.B.; STEPHEN, W.C.; KUNIYOSHI, S.; SHI, J. Centrally administered pertussis toxin inhibits microglia migration to the spinal cord and prevents dissemination of disease in and EAE mouse model. **PLOS ONE**, v. 5, n. 8, E 12400, p. 1-14, 2010.

YONG, V.W. Differential mechanisms of action of interferon-beta and glatiramer acetate in MS. **Neurology**, v.59, n.6, p.802-808, Sep. 2002.

ZANG, Y. C.; HALDER, J. B.; SAMANTA, A. K.; HONG, J.; RIVERA, V. M.; ZHANG, J. Z. Regulation of chemokine receptor CCR5 and production of RANTES and MIP-1 alpha by interferon-beta. **Journal of Neuroimmunology**, v.112(1-2), p.174-180, Jan. 2001.

ZELANTE, T.; DE LUCA, A.; BONIFAZI, P.; MONTAGNOLI, C.; BOZZA, S.; MORETTI, S.; BELLADONNA, M.L.; VACCA, C.; CONTE, C.; MOSCI, P.; BISTONI, F.; PUCCHETTI, P.; KASTELEIN, R.A.; KOPF, M.; ROMANI, L. IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance. **European Journal of Immunology**, v.37, n.10, p.2695-2706, Oct. 2007.

ZLOTNIK, A.; YOSHIE, O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. **Immunity**, v.12, n.2, p.121-127, 2000.

ANEXO

ANEXO A – Optical neuritis induced by different concentrations of myelin oligodendrocyte glycoprotein presents different profiles of the inflammatory process

RESEARCH ARTICLE

Optical neuritis induced by different concentrations of myelin oligodendrocyte glycoprotein presents different profiles of the inflammatory process

Rubens Murilo Gibaile Soares^{1,2}, Alyria Teixeira Dias², Sandra Bertelli Ribeiro De Castro², Caio Cesar Souza Alves², Marcilene Gomes Evangelista², Luan Cristian Da Silva², Rogério Estevam Farias³, Maria Christina Marques Nogueira Castanon³, Maria Aparecida Juliano⁴, and Ana Paula Ferreira²

¹Department of Ophthalmology, University Hospital of the Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil, ²IMUNOCET – Department of Parasitology, Microbiology and Immunology and ³Department of Morphology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil, and ⁴Department of Biophysics, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Abstract

Optical neuritis (ON) is characterized by inflammation of the optic nerve, and is one of the first clinical signs of multiple sclerosis (MS). Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is the animal model used to study MS and ON. The present study evaluated the induction, development and progression of ON using an EAE model induced by 100 µg or 300 µg of MOG_{35–55}. An EAE model was induced in C57BL/6 mice by tail base injection of 100 µg or 300 µg of MOG_{35–55} in complete Freund's adjuvant, supplemented with *Mycobacterium tuberculosis*. On the day of injection and 48 h later, animals received intraperitoneally 300 ng of pertussis toxin. On days 7, 10, 14, 21 and 58 the optic nerve was dissected for histological analysis, production of CCL5 and immunohistochemical detection of CD4 and CD8. The histological changes observed in the optic nerves consisted of inflammatory cell infiltrates showing varying degrees of ON in the two groups. The onset of ON in the 300 µg of MOG_{35–55} group was coincident with higher production of CCL5, on day 10 after induction. However, the 100 µg MOG_{35–55} group showed more intense inflammatory infiltrate on day 14 after induction, with higher amounts of CD4 and CD8, reaching an excessive demyelination process on days 21 and 58 after induction. The results suggest that two different concentrations of MOG_{35–55} lead to different forms of evolution of optic neuritis.

Keywords

Experimental autoimmune encephalomyelitis, immunohistochemistry, multiple sclerosis, MOG, optic nerve

History

Received 7 January 2013
Revised 27 March 2013
Accepted 14 April 2013
Published online 11 June 2013

Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory demyelinating disease that affects the central nervous system [1]. Optic neuritis (ON) is an acute inflammation in the optic nerve with axonal injury that may cause loss of sight [2].

Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is an animal model for the study of MS and also ON. C57BL/6 mice have been used in the induction of EAE for the study of optic neuritis, especially when using the peptide MOG_{35–55} in the induction [3,4].

Leukocyte infiltration contributes to the pathogenesis of autoimmune inflammation in the central nervous system in MS and EAE. In acute monosymptomatic ON, there is a high

concentration of T cells expressing the CCL5 receptor in the cerebrospinal fluid of patients with MS [5]. CCL5 is one of the chemokines related to the migration of leucocytes to the brain of EAE induced mice [6].

Different studies have shown that the animal's genetic background and the antigen used in the induction are related to different pathological development of EAE and ON [3,7,8]. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of 100 µg or 300 µg of peptide MOG_{35–55} in the induction, development and progression of ON in the C57BL/6 EAE model.

Methods

Animals

Female C57BL/6 mice 4–6 weeks old were obtained from the animal care facilities of the Federal University of Juiz de Fora (UFJF). All protocols involving mice handling were approved by the UFJF Committee on the use of laboratory animals (Protocol n° 997/2011).

Correspondence: Ana Paula Ferreira Imunocet, Department of Parasitology, Microbiology and Immunology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, 35056-900, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil. Tel/Fax: +55 32 21022214. E-mail: ana.paula@ufjf.edu.br

EAE induction

Mice ($n=8$ /group/euthanasia day) were subcutaneously immunized with 100 μ g or 300 μ g of myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) peptide 35–55, synthesized in the Biophysics Laboratory, Federal University of São Paulo, emulsified *v/v* in complete Freund's adjuvant (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) supplemented with 400 μ g of attenuated *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (Difco, Detroit, MI). Pertussis toxin 300 ng/animal (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) was injected intraperitoneally on the day of immunization and 2 days later. The mice were evaluated and the clinical signs of EAE observed daily for up to 58 days after immunization. The clinical status was assessed individually as previously presented [9]. On days 7, 10, 14, 21 and 58 post immunization, animals were euthanized under anesthesia. The portion of the optic nerve between the ocular globe and the optic chiasm was collected, and submitted to histopathological evaluation and immunological analysis.

Histopathological evaluation

The optic nerves were dissected and fixed in 10% buffered formalin and then cut into 5- μ m-thick sections. Tissues were stained with hematoxylin/eosin (H&E) to assess tissue damage and inflammation, and stained in the luxol fast blue protocol to qualify demyelination.

The evaluation of the presence of inflammatory cell infiltrates in longitudinal sections of the optic nerve on a scale from 0 to 4 was made by a masked observer; 0=no infiltration, 1=mild cellular infiltration of the optic nerve or optic nerve sheath, 2=moderate infiltration, 3=severe infiltration, 4=massive infiltration of the optic nerve parenchyma and nodule infiltration [10]. The histological analyses were made by a masked observer. Microscopic photographs were taken with a digital camera system attached to the microscope (Olympus BX51, Melville, NY) using the Image Pro Plus software (Media Cybernetics TM, Rockville, MD) and are representative of the groups.

Immunohistochemistry

For immunohistochemistry of the optic nerves, 4 μ m tissue sections were used. Deparaffinization, rehydration and antigen retrieval was performed by the HIER method using Trilogy™ (Cell Marque, Rocklin, CA). Endogenous peroxidase was inactivated with 3% H₂O₂ in 70% methanol for 20 min. The antibodies used were rabbit anti-mouse CD4 antibody (CMC10431020, 1:50, Cell Marque; Antigen retrieval with phosphate buffer) and rat anti-mouse CD8 antibody (CMC10829022, 1:50, Cell Marque; Antigen retrieval with trys buffer), primary antibodies diluted in DAKO diluent (#K80006). Sections were then incubated for 30 min. Antigen-antibody complexes were amplified with a HiDef HRP Mouse/Rabbit Polymer detection System kit (Cell Marque) and revealed with a DAB+ Chromogen kit (K8000, Dako).

The immunohistochemistry analyses were made by two different observers and the identification of T cells (CD4 and CD8) were realized using the microscope Olympus BX51 at

4 \times , 10 \times , 20 \times and 40 \times magnifications. The morphometrical analyses were made by manual counting at Image Pro Plus software (Media Cybernetics TM). Six fields were evaluated at 20 \times magnification in all groups. After this analysis, representative images of the groups at 20 \times magnification were taken with a digital camera system attached to the microscope (Olympus BX51) using the Image Pro Plus software.

CCL5 production

The optic nerve was dissected, weighed and homogenized (100 mg of tissue/mL) in extraction solution containing 0.4 M NaCl, 0.05% Tween 20 (Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ), 0.5% bovine serum albumin (BSA), 0.1 M phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 0.1 M benzethonium chloride, 10 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and 20 kIU/ml aprotinin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). The homogenate was centrifuged at 2000 \times g for 15 min at 4°C and supernatants were collected to determine the concentration of CCL5 by ELISA using paired monoclonal antibodies commercially available (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA) according to the manufacturer's instruction. Briefly, 96 wells plate was coated for 18 hours with capture antibody of CCL5. The plate was washed and blocked with PBS+10% fetal bovine serum, washed again and the samples and the recombinant curves were added.

After 2 h of incubation, room temperature, the plate was washed and the working detector (detection antibody + streptavidin-HRP) was added. After 1 h of incubation the plate was washed and the substrate (TMB) was added. The reaction was stopped with 2 N H₂SO₄ and the plate read at the microplate reader Spectramax 190 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). The concentrations are commensurate with the manufacturer's instructions in comparison to a recombinant standard curve. Results are expressed as the mean concentration of optic nerve supernatants for each group.

Statistical analysis

Results represent at least two independent experiments. The data were analyzed using the Kruskal–Wallis test (GraphPad Prism 5.00; GraphPad Software, San Diego, CA), and the differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results

Clinical signs of EAE were observed in the 100 μ g MOG_{35–55} group and the 300 μ g MOG_{35–55} group in relation to the control (non-immunized) group and no difference in the mean clinical score was observed among the groups (Figure 1).

The mean clinical score (MCS) of EAE (Figure 1A) and the mean score of inflammation (MSI) of ON (Figure 1B) were not observed on day 7 post-immunization in either immunized group. On day 10, both groups showed mild MCS, while only the 300 μ g MOG_{35–55} group presented MSI. From day 14, both groups showed MCS and MSI. The observed peak of MSI was on the 14th day post-immunization, while the MCS peak was on the 21st day post-immunization. In both groups, MCS and MSI decreased after the peak

DOI: 10.3109/0916934.2013.796938

Optical neuritis with different inflammation profiles 3

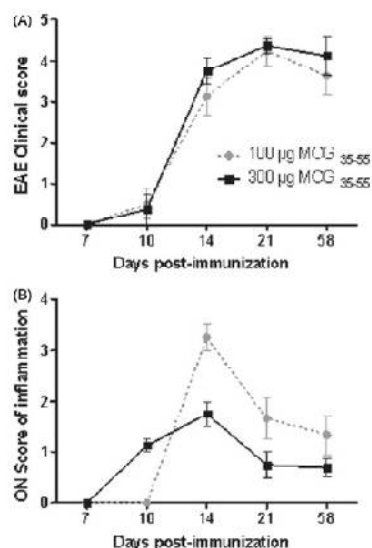


Figure 1. EAE clinical score and ON score of inflammation of C57BL/6 mice immunized with 100 µg or 300 µg of myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG₃₅₋₅₅) peptide. EAE clinical score (A) and ON score of inflammation (B) ($n = 8$ per group) were registered from day 0 to day 58 post-immunization. Each point represents mean \pm SEM. Results are representative of three different experiments.

Table 1. Frequency of EAE and ON in C57BL/6 mice immunized with 100 µg or 300 µg of myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG₃₅₋₅₅) peptide.

Days post-immunization	100 µg MOG ₃₅₋₅₅		300 µg MOG ₃₅₋₅₅	
	EAE	ON	EAE	ON
7	0/8	0/8	0/8	0/8
10	2/8	0/8	1/8	8/8
14	8/8	8/8	8/8	8/8
21	8/8	8/8	8/8	6/8
58	8/8	3/8	8/8	6/8

(Figure 1). The frequency of optic neuritis and EAE are shown in Table 1.

The histological sections of the optic nerve of the control group demonstrated normal histology without the presence of inflammatory cell infiltrates (Figure 2A). On day 7 after immunization, inflammatory cell infiltrates were not observed in the optic nerve of mice of either immunized group (Data not shown). On day 10 post-immunization a discrete inflammatory infiltrate was observed only in the 300 µg MOG₃₅₋₅₅ group (Figure 2C). The inflammatory infiltrate was higher on day 14 after immunization in both groups, but was more intense in the 100 µg MOG₃₅₋₅₅ group (Figure 2D, E). After this point, a gradual reduction in the inflammatory infiltrate was observed in both groups (Data not shown).

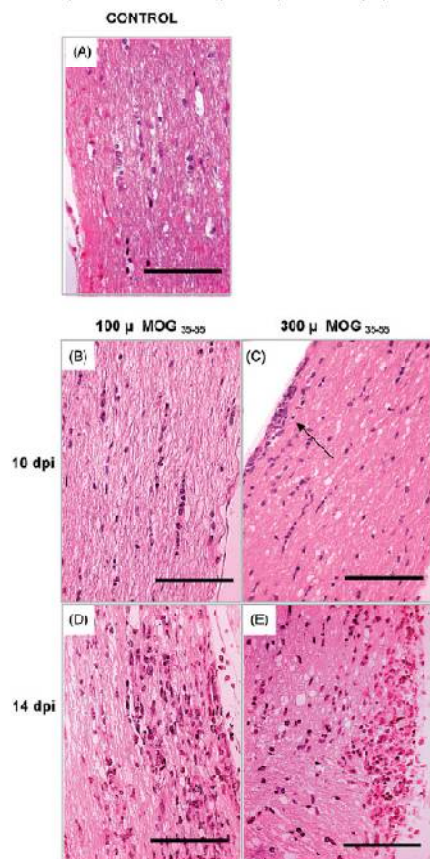


Figure 2. Inflammation of optic nerve of C57BL/6 mice immunized with 100 µg or 300 µg of myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG₃₅₋₅₅) peptide. The figures are representative of the histological analysis of mice on days 10 and 14 post-immunization (dpi) with 100 µg MOG₃₅₋₅₅ (B, D) or 300 µg MOG₃₅₋₅₅ (C, E). The optic nerve section was stained with H&E and captured at magnifications of 40 \times , bar scale = 50 µm. Arrow = inflammatory infiltrate.

The demyelination process was not observed in the control group (Figure 3A) nor on the 7th day post-immunization in the two immunized groups (Figure 3B, C). On day 10 post-immunization a mild demyelination was observed only in the 300 µg MOG₃₅₋₅₅ group (Figure 3E). On day 14 after immunization isolated sites of demyelination were observed in both groups (Figure 3F, G). On day 21 and 58 post-immunization the demyelination process was more severe in the 100 µg MOG₃₅₋₅₅ group (Figure 3H–K).

The evaluation of CD4 and CD8 in the optic nerves showed absence of these markers in the control group (Figure

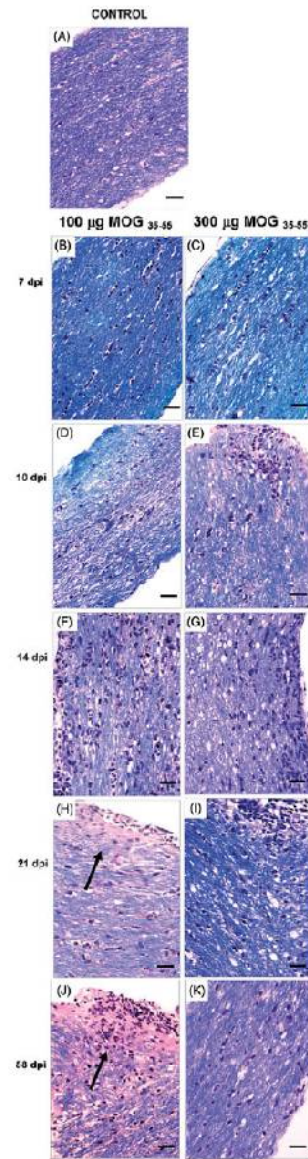


Figure 3. Demyelination of optic nerve of C57BL/6 mice immunized with 100 µg or 300 µg of myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG₃₅₋₅₅) peptide. The figures are representative of the histological analysis of mice on days 7, 10, 14, 21 and 28 post-immunization (dpi) with 100 µg MOG₃₅₋₅₅ (B, D, F, H, J) or 300 µg MOG₃₅₋₅₅ (C, E, G, I, K). The optic nerve section was stained with the luxol fast blue protocol and captured at magnifications of 40 \times , bar scale = 20 µm. Arrow – demyelination site.

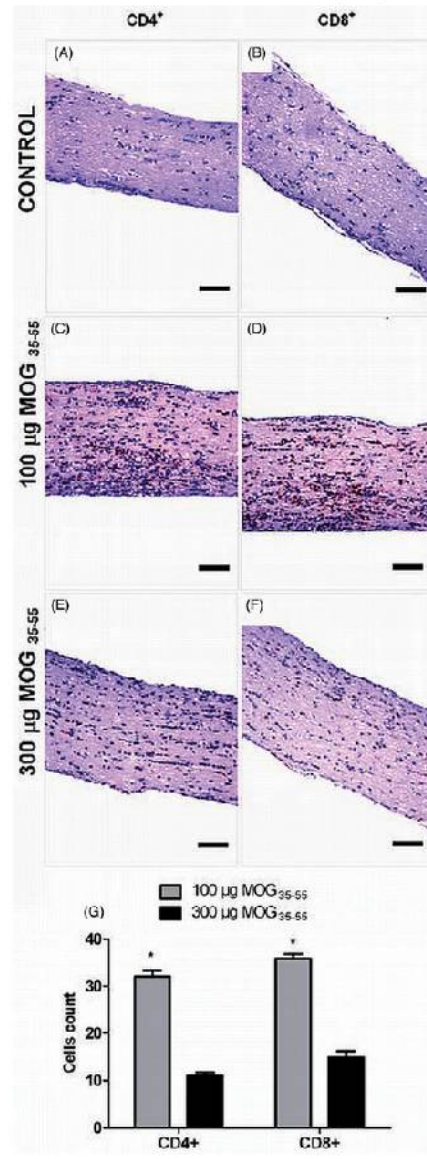


Figure 4. Immunohistochemistry detection of CD4 and CD8 in the optic nerve of C57BL/6 mice immunized with 100 µg or 300 µg of myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG₃₅₋₅₅) peptide. The figures are representative of the immunohistochemical detection of CD4 (A, C, E) and CD8 (B, D, F) of mice on day 14 post-immunization (dpi) with 100 µg MOG₃₅₋₅₅ (C, D) or 300 µg MOG₃₅₋₅₅ (E, F). Magnification of 20 \times , bar scale = 50 µm. (G) Morphometrical evaluation of the immunohistochemical figure. Bars represent mean.

DOI: 10.3109/08916934.2013.796638

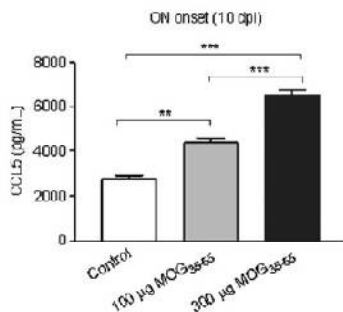


Figure 5. Production of CCL5 in the optic nerve of mice of the following groups: (i) control, (ii) 100 µg MOG₃₅₋₅₅, (iii) 300 µg MOG₃₅₋₅₅. Bars represent: mean ± SEM. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

4A, B) and showed an intense frequency of CD4 (Figure 4C) and CD8 (Figure 4D) in the 100 µg MOG₃₅₋₅₅ group on day 14 after immunization higher than in the 300 µg MOG₃₅₋₅₅ group. Moreover the 100 µg MOG₃₅₋₅₅ group showed 3 times more CD4⁺ and CD8⁺ cells than the 300 µg MOG₃₅₋₅₅ group (Figure 4G).

CCL5 was evaluated at the onset of inflammatory infiltrate (10 dpi) to establish if the alterations observed in the inflammatory infiltrate could be related to alterations in the production of CCL5 at the beginning of this infiltrate. The result showed higher production in the 300 µg MOG₃₅₋₅₅ group compared to the 100 µg MOG₃₅₋₅₅ group (Figure 5).

Discussion and conclusions

ON can be an early clinical manifestation in MS patients. MOG-induced ON is a reproducible animal model that is used to study the relationship between encephalomyelitis and ON. The present study evaluates the concentrations of 100 µg and 300 µg of MOG₃₅₋₅₅ on the development of clinical signs of EAE and ON on the 7th, 10th, 14th, 21st and 58th day. The clinical signs of EAE were not different among the groups; however different forms of evolution of ON were observed, which suggests that variations in the MOG₃₅₋₅₅ concentration were capable of inducing different profiles of ON in this model.

The use of different concentrations of MOG₃₅₋₅₅ in the induction can consolidate the understanding of the pathology of ON. The present results showed different inflammatory and severity progression in the optic nerve in both groups, with a peak of inflammation on the 14th day post-immunization. It is important to note that although 100 µg of MOG₃₅₋₅₅ delayed the onset of ON, severity was greater at the peak. Although EAE can be induced by several myelin proteins, MOG induction causes lesions mainly in the optic nerve, explained by the higher expression and localization of MOG on the outer surface of the optic nerve [11].

In this study ON appeared in both immunized groups. Although ON was first observed in the 300 µg MOG₃₅₋₅₅ group, the 100 µg MOG₃₅₋₅₅ group showed more severe inflammatory cell infiltrate at the peak of ON. A study

Optical neuritis with different inflammation profiles 5

comparing ON development in C57BL/6 mice by immunization with 200 µg or 50 µg of peptide MOG₃₅₋₅₅ in complete Freund's adjuvant showed an early onset when the mice were immunized with the higher concentration of MOG₃₅₋₅₅. This result suggests that increasing the concentration of MOG could develop earlier onsets, probably due to the localization of the MOG on the optic nerve surface [3].

In the present study, the lower concentration of MOG₃₅₋₅₅ showed greater inflammatory severity, contrasting with a previous study where ON was higher in the group immunized with more peptide MOG₃₅₋₅₅ [3]. This could be explained by the concentration and day of injection of pertussis toxin, since the authors used a high concentration of toxin (400 ng) injected on the day before and 24 h after the induction, and in the present study a lower concentration of pertussis toxin (300 µg) was used injected on the day and 48 h after the induction. Therefore, the time of application and concentration of the pertussis toxin could directly influence antigen presentation and immune response [12,13].

The present results showed an earlier peak in inflammation in ON when related to the clinical score of EAE. This is consistent with observation on multiple sclerosis (MS) patients, of whom approximately 30% to 60% showed early clinical manifestations of ON [14]. In addition, pathologic inflammation of ON may precede the clinical signs of EAE [3].

The higher concentration of CCL5 observed in the optic nerve of the 300 µg MOG₃₅₋₅₅ group compared with the 100 µg MOG₃₅₋₅₅ group, may explain the early onset of the cellular inflammatory infiltrate in the 300 µg MOG₃₅₋₅₅ group at day 10 post-immunization. CCL5 is a chemokine involved in EAE by mediating leukocyte influx into the CNS; moreover, treatment with anti CCL5 antibody prevented leukocytic adhesion in brain microvasculature in an EAE model [5,15].

The demyelination process of the optic nerves and the central nervous system is characteristic of MS and EAE, resulting in the axonal damage leading to the impairment of the neurons [16,17]. The infiltration of T CD4⁺ cells that are autoreactive against myelin has been considered one of the main factors responsible for the damage observed in MS and EAE [18]. In the present study an intense inflammatory infiltrate with high amounts of CD4 and CD8 cells was observed on day 14 of the 100 µg MOG₃₅₋₅₅ group which could suggest a correlation with the severe demyelination process of the optic nerve observed on day 21 and 58 of this group.

Although the use of elevated concentrations of MOG can induce more severe disease the results of this study were not altered with 300 µg of MOG₃₅₋₅₅ [8]. Previous study showed that active presenting cells were not generated after increase the concentration of MOG; incurring in reduced autoreactive CD4 cells in the periphery [19]. Moreover the antigen presentation efficacy may be consequence of the increased doses of adjuvants used, as showed in previous studies [20-23].

The results of the present study contribute to the understanding of optic neuritis, demonstrating the development of the disease in two different concentrations of MOG₃₅₋₅₅ peptide.

6 R. M. G. Soares et al.

Acknowledgements

Funding sources: CNPq (481459/2009-0, 303359/2009-4 and 150017/2013-8), FAPEMIG (02236/10 and PPM 0216/10) and CAPES (PNPD-2882/2011).

Declaration of interest

The authors declare no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

References

1. Sospedre, M., and R. Martin. 2005. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol.* 23: 683–747.
2. Compston, A., and A. Coles. 2008. Multiple sclerosis. *Lancet.* 372: 1502–1517.
3. Shao, H., Z. Huang, S. I. Sun, H. J. Kaplan, and D. Sun. 2004. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T-cells induce severe optic neuritis in the C57BL/6 mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 45: 4060–4065.
4. Chandhury, P., G. Marracel, X. Yu, D. Galperin, B. Morris, and D. Bourdette. 2011. Lipic acid decreases inflammation and confers neuroprotection in experimental autoimmune optic neuritis. *J Neuroimmunol.* 233: 90–96.
5. Teleshova, N., M. Paschenkov, Y. M. Huang, M. Soderstrom, P. Kivisikk, V. Kostulas, M. Haglund, and H. Link. 2002. Multiple sclerosis and optic neuritis: CCR5 and CXCR3 expressing T cells are augmented in blood and cerebrospinal fluid. *J Neurol.* 249: 723–729.
6. Dos Santos, A. C., M. M. Barsante, R. M. E. Arantes, C. C. A. Bernard, M. M. Teixeira, and J. Carvalho-Tavares. 2005. CCL2 and CCL5 mediate leukocyte adhesion in experimental autoimmune encephalomyelitis: an intravital microscopy study. *J Neuroimmunol.* 162: 122–129.
7. Kuerten, S., D. A. Kostova-Bales, L. P. Frenzel, J. T. Tigne, M. Vary-Lehmann, D. N. Angeliev, and P. V. Lehmann. 2007. MPA- and MOG:35–55-induced EAE in C57BL/6 mice differentially targets brain, spinal cord and cerebellum. *J Neuroimmunol.* 185: 31–40.
8. Berard, J. L., K. Wolak, S. Feunier, and S. David. 2010. Characterization of relapsing–remitting and chronic forms of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *Glia.* 58: 434–445.
9. De Paula, M. L., D. H. Rodrigues, H. C. Teixeira, M. M. Barsante, M. A. Souza, and A. P. Ferreira. 2008. Genistein down-modulates proinflammatory cytokines and reverses clinical signs of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Int Immunopharmacol.* 8: 1291–1297.
10. Adams, G., L. Drown, S. Andrew, R. Meza-Romero, G. G. Burrows, and A. A. Vandenbark. 2011. Neuroprotective effects of recombinant T-cell receptor ligand in autoimmune optic neuritis in HLA-DR2 mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 53: 406–412.
11. Benelli, E., M. Pagary, H. L. Weiner, C. Linnington, R. A. Sobel, and V. K. Kuchroo. 2003. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis. *J Exp Med.* 197: 1073–1081.
12. Bagley, K. C., S. F. Abdelwahab, R. G. Tuskan, T. R. Fouts, and C. K. Lewis. 2002. Pertussis toxin and the adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis* activate human monocyte-derived dendritic cells and dominantly inhibit cytokine production through a cAMP-dependent pathway. *J Leukoc Biol.* 72: 962–969.
13. Hou, W., Y. Wu, S. Sun, M. Shi, Y. Sun, C. Yang, G. Pei, et al. 2003. Pertussis toxin enhances Th1 responses by stimulation of dendritic cells. *J Immunol.* 170: 1728–1736.
14. Söderström, M., J. Ya-Ping, J. Hillert, and H. Link. 1998. Optic neuritis: prognosis for multiple sclerosis from MRI, CSF, and HLA findings. *Neurology.* 50: 708–714.
15. Rodrigues, D. H., N. Lacerda Quairoz, A. S. de Miranda, C. T. Fagundes, R. D. I. Campos, R. F. Arantes, M. C. Vilela, et al. 2011. Absence of PAF receptor alters cellular infiltrate but not rolling and adhesion of leukocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Res.* 1385: 298–306.
16. Hirsch, A., J. Schuchardt, S. Runcovsk, T. Kuhlmann, and W. Brück. 2000. Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain.* 123: 1174–1183.
17. Dutta, R., A. Chang, M. K. Doud, G. J. Kidd, M. V. Ribaudo, E. A. Young, R. J. Fox, et al. 2011. Demyelination causes synaptic alterations in hippocampi from multiple sclerosis patients. *Ann Neurol.* 69: 445–454.
18. Fletcher, J. M., S. J. Lalor, C. M. Sweeney, N. Tahrir, and K. H. G. Mills. 2010. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol.* 162: 1–11.
19. Wu, G. F., K. S. Shindler, E. J. Allenspach, T. L. Stephen, H. L. Thomas, R. J. Mikesell, A. H. Cross, and T. M. Lauffer. 2011. Limited sufficiency of antigen presentation by dendritic cells in models of central nervous system autoimmunity. *J Autoimmun.* 26: 55–64.
20. Billiau, A., and P. Matthys. 2001. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *J Leukoc Biol.* 70: 849–860.
21. Chen, X., R. T. Winkler-Pickett, N. H. Carbonetti, J. R. Orlando, J. J. Oppenheim, and O. M. Zack Howard. 2006. Pertussis toxin as an adjuvant suppresses the number and function of CD4+ CD25+ T regulatory cells. *Eur J Immunol.* 36: 671–680.
22. Kai, H., K. Shibuya, Y. Wang, H. Kameta, T. Kamoyama, S. Tanaka-Hanaoka, A. Miyamoto, et al. 2006. Critical role of *M. tuberculosis* for dendritic cell maturation to induce collagen-induced arthritis in H-2b background of C57BL/6 mice. *Immunology.* 118: 233–239.
23. Berard, J. L., B. J. Kerr, H. M. Johnson, and S. David. 2010. Differential expression of SOCS1 in macrophages in relapsing–remitting and chronic EAE and its role in disease severity. *Glia.* 58: 1816–1826.