

CAMILA MARQUES DE FRERIA

**INFLUÊNCIA DA EXPRESSÃO DO MHC I E DA REAÇÃO GLIAL NA
PLASTICIDADE SINÁPTICA DE MOTONEURÔNIOS MEDULARES DURANTE
A ENCEFALOMIELITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL.**

CAMPINAS

2009

CAMILA MARQUES DE FRERIA

**INFLUÊNCIA DA EXPRESSÃO DO MHC I E DA REAÇÃO GLIAL NA
PLASTICIDADE SINÁPTICA DE MOTONEURÔNIOS MEDULARES DURANTE
A ENCEFALOMIELITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL.**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira

Co-orientadora: Profa. Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos

CAMPINAS

2009

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

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

F891i Freria, Camila Marques
 Influência da expressão do MHC I e da reação glial na
 plasticidade sináptica de motoneurônios medulares durante a
 encefalomielite / Camila Marques Freria. Campinas, SP : [s.n.], 2009.

Orientadores : Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira, Leonilda
Maria Barbosa dos Santos

Dissertação(Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Esclerose múltipla. 2. Medula espinhal. 3. Plasticidade. 4.
Sistema Nervoso Central. I. Oliveira, Alexandre Leite Rodrigues de.
II. Santos, Leonilda Maria Barbosa dos. III. Universidade Estadual
de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

**Título em inglês : MHC 1 expression and glial reaction influence spinal
motoneuron synaptic plasticity during the course of experimental
autoimmune encephalomyelitis**

Keywords: • Multiple sclerosis

- Spinal cord
- Plasticity
- CNS

Titulação: Mestre em Clínica Médica

Área de concentração: Ciências Básicas

Banca examinadora:

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira

Profa. Dra. Tânia de Fátima Salvini

Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner

Data da defesa: 26-02-2009

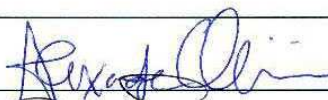
Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Camila Marques de Freria

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues De Oliveira

Membros:

1. Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues De Oliveira



2. Prof. Dr. Ricardo De Lima Zollner



3. Prof^a. Dr^a. Tania de Fátima Salvini



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

Data: 26/02/2009

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais que sempre me apoiaram,
estiveram presentes e acreditaram em meu potencial.*

AGRADECIMENTOS

- Em primeiro lugar a Deus por me colocar nos lugares certos e me permitir conviver com pessoas maravilhosas em cada etapa da minha vida. Agradeço também pela força e sabedoria que me concede a cada dia.
- Agradeço ao Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira, a quem pacientemente me orientou neste trabalho tornando possível a realização desta tese e por sua grande contribuição para a minha formação científica.
- À Profa. Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos, a quem me co-orientou e prestou importante auxílio na imunologia e ao seu aluno de doutorado Alessandro dos Santos Farias, que me auxiliou na técnica de indução dos animais.
- Aos funcionários do Departamento de Anatomia: aos técnicos de laboratório, Nori e Marquinho, que sempre nos auxiliam com boa vontade e presteza. À secretária Ana, à bioterista Marlene e ao porteiro Carlão.
- Às técnicas do Centro de Microscopia Eletrônica, Antônia, Aurora e Adriane, que sempre nos auxiliaram no microscópio eletrônico de transmissão e à secretária Cidinha.
- Ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica, ao coordenador Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner, às secretárias Cristiane e Adriana e em especial ao Prof. Dr. Licio Augusto Velloso
- Ao Biotério Central da UNICAMP, de onde vieram os animais que participaram desta tese, e também à vida de cada um dos animais envolvidos nos experimentos.
- À FAPESP, meus agradecimentos pelo auxílio financeiro em equipamento, material de consumo, bolsa e auxílio viagem, permitindo, assim, a viabilidade deste trabalho e do Laboratório de Regeneração Nervosa.

- À Profa. Dra Tânia de Fátima Salvini que me orientou na iniciação científica e por quem tenho profunda admiração, me estimulando a progredir na carreira científica e acadêmica. Ao seu aluno Thiago Luiz de Russo que pacientemente me auxiliou na minha primeira experiência científica e por seu grande empenho e dedicação.
- A todos os alunos do Departamento de Anatomia da UNICAMP e do Laboratório de Regeneração Nervosa: Renata, Amanda, Sheila, Roberta, Gabriel, Juliana, Gustavo, Rodrigo, Luciana, Aline, Jéssica e aos egressos Amauri, Aninha, Karina e Mário.
- Aos meus pais Maria e João e ao meu irmão Anderson que sempre estiveram presentes e me apoiaram. Especialmente a minha mãe querida, por me fortalecer com palavras de carinho e otimismo.
- Ao meu namorado Diego por todo carinho, paciência e companheirismo.
- Às amigas de república Ju, Tati e Valéria, meus agradecimentos pela compreensão e paciência e também às amigas de coração que sempre me apoiaram e estiveram presentes na minha formação Ju Harue, Laila e Ana Carolina.

RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvii
1.INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Anatomia do Sistema Nervoso, Medula Espinhal e Motoneurônios Medulares.....	20
1.2 Células do Sistema Nervoso.....	21
1.3 Interação neurônio-glias.....	22
1.4 Interação do Sistema Imune e Sistema Nervoso na neurodegeneração.....	24
1.5 Papel do MHC I no Sistema Nervoso.....	26
1.6 Plasticidade Sináptica.....	28
1.7 Esclerose Múltipla.....	29
1.8 Encefalomielite Autoimune Experimental.....	31
1.9 Mecanismos da doença na EM.....	33
2. OBJETIVOS.....	36
2.1 Objetivos gerais.....	37
2.2 Objetivos específicos.....	37
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
3.1 Grupos experimentais.....	39
3.2 Indução da EAE.....	39
3.3 Sacrifício dos animais e processamento para imunoistoquímica.....	41
3.3.1 Análise quantitativa da imunoistoquímica.....	42
3.3.2 Análise estatística em imunoistoquímica.....	42
3.4 Sacrifício dos animais e processamento dos espécimes para microscopia eletrônica.....	43
3.4.1 Análise das secções ultra-finas.....	44

3.4.2 Quantificação em microscopia eletrônica de transmissão.....	45
3.4.3 Análise estatística em microscopia eletrônica de transmissão.....	46
4. RESULTADOS.....	47
4.1 Aumento da expressão de MHC I em EAE	48
4.2 Redução da expressão de sinaptofisina no curso da.EAE.....	50
4.3 Aumento da reatividade glial em EAE.....	52
4.4 Análise ultra-estrutural do aumento da eliminação sináptica durante a EAE.....	56
4.5 Padrão da distribuição dos terminais após indução EAE.....	61
5. DISCUSSÃO.....	63
6. CONCLUSÕES.....	68
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
8. APÊNDICE.....	82

AG- Acetato de Glatiramer

APC- Células apresentadoras de antígenos

APP- Proteína precursora de amilóides

BDNF- *Brain derived neurotrophic factor* (fator neurotrófico derivado do cérebro)

BSA- *Bovine Serum Albumin* (albumina de soro bovino)

CNTF- Fator neurotrófico ciliar

EAE- Encefalomielite Autoimune Experimental

EM- Esclerose Múltipla

GDNF- *Glial cell derived neurotrophic factor* (fator derivado de células gliais)

GFAP- *Glial Fibrillary Acidic Protein* (proteína ácida fibrilar glial)

IFN λ - Interferon gama

IGF-1- Fator de crescimento semelhante insulina 1

IL1- Interleucina 1

TLRs- *Toll-like receptors*

LIF- Fator inibidor de leucemia

MBP- *Myelin Basic Protein*

MOG- Glicoproteína de mielina de oligodendrócitos

MET- Microscopia eletrônica de transmissão

MHC I- complexo principal de histocompatibilidade de classe I

MHC II- complexo principal de histocompatibilidade de classe II

NK- *Natural Killer*

NK-T- *células T Natural Killer*

NMDA- *N- methyl D-aspartic acid* (N-metil D-aspartato)

NO- óxido nítrico

PLP- proteolipoproteína

RE- Retículo endoplasmático

RM- Ressonância Magnética

SI- Sistema Imune

SN- Sistema nervoso

SNC- Sistema Nervoso Central

SNP- Sistema Nervoso Periférico

TBS-T- *Tris-Buffered Saline Tween-20* (tampão Tris-Tween20)

TGF- *Transforming Growth Factor* (fator de crescimento de transformação)

TH1- Células T Helper 1

TH2- Células T Helper 2

TNF - *Tumoral Necrosis Factor* (Fator de necrose tumoral)

Figura 1. Camundongos submetidos à EAE e graduação dos sinais clínicos.....	40
Figura 2. Seqüência de fotomicrografias eletrônicas de transmissão.....	45
Figura 3. Fotomicrografia mostrando os três tipos de terminais pré-sinápticos.....	46
Figura 4. A expressão de MHC I no corno anterior da medula.....	49
Figura 5. A expressão de sinaptofisina no corno anterior da medula.....	51
Figura 6. A reatividade glial no corno anterior da medula.....	53
Figura 7. A expressão de IBA1 no corno anterior medula.....	54
Figura 8. Gráfico representando a correlação entre a imunoquantificação em diferentes estágios da doença.....	55
Figura 9. Análise ultra-estrutural da medula lombar.....	57
Figura 10. Cobertura e terminais sinápticos.....	60
Figura 11. Distribuição dos espaços entre terminais na membrana do motoneurônio....	62

RESUMO

Estudos recentes têm mostrado que a expressão do complexo de histocompatibilidade principal de classe I (MHC I) influencia diretamente na estabilidade dos terminais sinápticos. Considerando que na encefalomielite autoimune experimental (EAE) observa-se significativo impacto sobre as sinapses dos motoneurônios medulares durante a fase aguda da doença, sugere-se que o MHC I pode exercer influência na estabilidade dos terminais sinápticos na EAE. Dessa forma, o presente trabalho investigou em camundongos C57BL/6J a cobertura sináptica dos motoneurônios durante o surto e as remissões progressivas da EAE. Estes animais foram divididos em 4 grupos: normal, surto (grau 3), 1ª remissão (1º estágio de recuperação- 30 dias após indução) e 2ª remissão (2º estágio de recuperação- 40 dias). Suas medulas foram processadas para imunoistoquímica e microscopia eletrônica de transmissão (MET). Os resultados indicaram aumento da reatividade glial durante a fase de surto. Neste período a análise ultra-estrutural mostrou redução da cobertura sináptica dos motoneurônios, correlacionada com redução da expressão da sinaptofisina e aumento da expressão do MHC I. Os resultados observados em ambos os grupos remissão indicaram aposição dos terminais sobre a superfície do motoneurônio. Entretanto a possível exaustão do potencial regenerativo ocorre após a 2ª remissão, sendo observada diminuição significativa do número das sinapses. Além disso, a razão entre terminais excitatórios/inibitórios está aumentada, indicando o desenvolvimento de possível processo excitotóxico. Os resultados obtidos indicam que a expressão do MHC I aumenta durante o curso da EAE na forma remitente/recorrente, correlacionando com os períodos de plasticidade sináptica. Além disso, o presente estudo indica que a expressão de MHC I e a reatividade glial durante as diferentes fases da doença estão correlacionados com os sinais clínicos da doença.

ABSTRACT

Recent studies have shown that the expression of the major histocompatibility complex of class I (MHC I) directly influences the stability of nerve terminals. Also, the acute phase of the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) has shown a significant impact on inputs within the spinal cord. Therefore, the present work investigated the synaptic covering of motoneurons during exacerbation and progressive remissions of the EAE. C57BL/6J mice were induced to the EAE and divided into 4 groups: normal, exacerbation (degree 3), first remission (30th day after EAE induction) e second remission (40th day). The animals were sacrificed and their lumbar spinal cords were processed for immunohistochemistry and transmission electron microscopy (TEM). The results indicate an increase of glial reaction during the exacerbation phase. In this period, the TEM analysis showed a reduction of the synaptic covering of motoneurons, corresponding to a reduction of synaptophysin immunolabeling and an increase of MHC I expression. The results observed in both remission groups indicated a return of terminals contact to the motoneuron surface. However, a possible exhaustion of the regenerative potential occurs after the 2nd remission, since the number of synapses decreases significantly. Also, the ratio between excitatory/inhibitory inputs increases, indicating the development of a possible excitotoxic process. In conclusion, the results presented herein indicate that MHC I upregulation during the course of the remittent/recurrent form of EAE correlates to the periods of synaptic plasticity induced by the infiltration of auto-reactive immune cells and that synaptic plasticity decreases after recurrent peaks of inflammation. Also, this study provided evidences that synaptic plasticity and the glial reactivity during the different phases of the MS disease, play an important role in the motor deficit and recovery that occur throughout the MS development.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Anatomia do Sistema Nervoso, Medula Espinhal e Motoneurônios Medulares.

O Sistema Nervoso (SN) é dividido anatomicamente em Sistema Nervoso Central (SNC) e Periférico (SNP). O SNC é composto pelo encéfalo e a medula espinhal que estão localizados, respectivamente, na cavidade craniana e no canal vertebral do esqueleto axial. O SNP é composto pelos nervos cranianos e espinhais, gânglios periféricos e terminações nervosas (Machado, 2002).

A medula é uma porção do SNC situada no interior do canal vertebral. Apresenta as intumescências cervical e lombar, de onde partem os nervos espinhais que compõem os plexos braquial e lombossacral, responsáveis pela inervação dos membros superiores e inferiores, respectivamente.

O nervo espinhal é formado da união da raiz dorsal, sensitiva, com a raiz ventral, motora. Na raiz dorsal localiza-se o gânglio espinhal, onde estão os corpos dos neurônios sensitivos. A raiz ventral é formada por axônios que se originam em neurônios situados nas colunas anterior e lateral da medula.

Na coluna anterior da medula estão localizados os corpos dos neurônios motores responsáveis pela inervação dos músculos esqueléticos. Estes se distinguem em neurônios motores alfa e gama. Os neurônios motores alfa são maiores e seu axônio, com grande diâmetro, destina-se à inervação de fibras musculares extrafusais que contribuem efetivamente para a contração dos músculos. Os neurônios gama são menores e possuem axônios mais delgados e são responsáveis pela inervação de fibras intrafusais dos fusos musculares.

Na coluna intermédia lateral presente de T1 a L2 e de S2 a S4, encontram-se os corpos dos neurônios pré-ganglionares do sistema nervoso autônomo, responsáveis pela inervação de músculos lisos, cardíacos e glândulas (Machado, 2002).

1.2 Células do Sistema Nervoso.

O sistema nervoso é composto primordialmente por dois tipos de células: neurônios e células da glia. A quantidade de células da glia é 10 à 50 vezes maior que o número de neurônios. Estas células têm a função de suporte, produção de mielina, fagocitose e manutenção de sinapses neurais. As células gliais dividem-se em 2 classes maiores: microglia e macroglia. A microglia se comporta como fagócitos que são mobilizados após a lesão, infecção ou doença. Já as células da macroglia são os oligodendrócitos, as células de Schwann e os astrócitos (Kandel et al., 2006).

Os astrócitos, de origem neuroectodérmica, são as células mais abundantes da população glial e essenciais para a homeostase do SNC e para a função neuronal (Farina et al., 2007). Além disso, os astrócitos ajudam a constituir a barreira hemato-encefálica, prevenindo que substâncias tóxicas entrem no microambiente do SN (Kandel et al., 2006).

A microglia é de origem hematopoiética e está presente desde os primeiros estágios do desenvolvimento. Uma das suas mais importantes funções é responder à lesões ou estresse celular e a sinais externos como os provenientes de patógenos (Sanders e De Keyser, 2007). A microglia tem o papel de propiciar um microambiente favorável à reparação e regeneração neural, atuando como os macrófagos residentes do SNC, com características de vigilância e controle imune. Assim, a microglia mostra-se reativa já nos

primeiros estágios pós-lesão do sistema nervoso, precedendo as demais células gliais. Desse modo, a microglia ativada pode destruir microrganismos, remover resíduos celulares potencialmente deletérios e ainda secretar fatores de crescimento, promovendo, com isso, a reparação do tecido e facilitando o retorno da homeostase (Kreutzberg, 1996).

Os neurônios são células especializadas na condução do impulso nervoso e constituem a unidade fundamental do SNC. Um neurônio típico é constituído de um corpo (soma), dendritos e um axônio. Contudo, o SNC contém uma ampla variedade de neurônios com diferentes morfologias e funções. A célula, como um todo, apresenta contatos com terminais ou botões sinápticos de outros neurônios, formando as sinapses. Funcionalmente os neurônios podem ser sensitivos, motores ou interneurônios. Cabe destacarmos os neurônios motores ou motoneurônios, que podem ser primários quando estão localizados na área motora do córtex cerebral, e projetam fibras nervosas que fazem conexões em níveis caudais com os motoneurônios secundários, localizados nos núcleos da base, no tronco encefálico e na coluna ventral da medula espinhal (Kandel et al., 2006).

O motoneurônio alfa é o foco de interesse no presente estudo. Este está localizado na medula espinhal, especificamente no corno anterior da substância cinzenta, apresentando-se em colunas longitudinais (Kandel et al., 2006).

1.3 Interação neurônio-glias.

As células da glia, até recentemente, eram consideradas apenas como provedoras de suporte estrutural e metabólico para o neurônio executar a transmissão sináptica. Recentemente estudos demonstram a existência de comunicação bidirecional entre células

da glia e neurônios participando assim, da modulação da fisiologia sináptica (Di Filippo et al., 2008; Emirandetti et al., 2006).

Os astrócitos têm uma localização estratégica tendo contato com outras células gliais, neurônios e vasos sanguíneos. Esta relação entre neurônio, astrócito e vasos sanguíneos faz dos astrócitos um importante modulador da atividade neuronal e do fluxo sanguíneo cerebral (Farina et al., 2007). Além disso, os astrócitos têm importante função na regulação da concentração de íons no espaço extra e intra-celular no SNC. O dióxido de carbono é produzido pelos neurônios através do metabolismo oxidativo do piruvato. Os astrócitos regulam o balanço ácido-base via balanço de carboxidrase que converte o dióxido de carbono e a água em íons de hidrogênio e bicarbonato (Maragakis e Rothstein, 2006).

Os astrócitos são também responsáveis pela manutenção e homeostase do glutamato. O glutamato é um neurotransmissor excitatório primário no SNC. Assim, sua atividade é regulada por influências neuronal e glial. Na sinapse, o glutamato liberado irá ativar os receptores metabotrópicos presentes nos astrócitos (Maragakis e Rothstein, 2006). Durante a resposta à lesão, os astrócitos podem aumentar o número de transportadores de glutamato, prevenindo assim a ação excitotóxica do glutamato, convertendo-o em glutamina. Além disso, os astrócitos podem restaurar a integridade da barreira hemato-encefálica, facilitar a revascularização, a remielinização e a sobrevivência neuronal através da síntese e liberação de fatores neurotróficos (Liberto et al., 2004). Entretanto, os astrócitos no SNC podem apresentar papel paradoxal, podendo desempenhar papel tanto neurotóxico como neuroprotetor.

Durante a astrogliose reativa, na Esclerose Múltipla (EM), a secreção de ácido hialurônico e glicosaminoglicanas, é capaz de inibir a diferenciação dos oligodendócitos. Por outro lado, a secreção de proteínas como o fator de crescimento-1 semelhante à insulina (IGF-1), fator inibidor de leucemia (LIF) e fator neurotrófico ciliar (CNTF), contribui para aumentar a sobrevivência dos oligodendrócitos (Bannerman et al., 2007).

A microglia apresenta distintas funções na apresentação de antígenos, na imunovigilância, na fagocitose e na neuroproteção. Assim, como nos astrócios, a microglia, também, pode apresentar papel neuroprotetor ou neurotóxico. Desse modo, ao produzir radicais livres de oxigênio, óxido nítrico (NO), receptores N-metil D-aspartic acid (NMDA), proteases e quimiocinas, a microglia pode apresentar um papel neurotóxico. Porém, esta pode ser neuroprotetora ao provocar, fisicamente, um afastamento dos elementos pós e pré-sinápticos. Esse desligamento das sinapses parece ser fundamental para a sobrevivência neuronal (Cullheim e Thams, 2007). Além disso, Glezer et al. (2005) mostraram que a microglia residente da medula óssea pode ser responsável em estimular a reparação da mielina, a remoção das toxinas do SNC e a prevenção de doenças neurodegenerativas.

1.4 Interação do Sistema Imune e Sistema Nervoso na neurodegeneração.

Degeneração nervosa é um processo onde estruturas e funções são progressivamente afetadas, podendo ser perdidas parcial ou totalmente. A neurodegeneração envolve alterações estruturais complexas, modificando a atividade das células nervosas, podendo resultar em eventual morte celular (Przedborski et al., 2003).

Por décadas o cérebro foi considerado um órgão imuno privilegiado. No entanto, estudos bioquímicos do sistema nervoso em diversas circunstâncias patológicas e fisiológicas revelaram que a inflamação no SNC constitui o principal mecanismo de defesa contra lesões (Tillex e Hermans., 2007).

Vários estudos têm mostrado que a magnitude da degeneração axonal é mais severa em doenças inflamatórias, pois fatores tóxicos liberados por macrófagos e pela microglia ativada podem atuar nos receptores de glutamato. O glutamato exerce uma ação direta no oligodendrócito, causando uma lesão excitotóxica e conseqüentemente um envolvimento na degeneração axonal. Em modelos de Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE) foi observado que o NO produzido em altas quantidades pelos macrófagos e por outras células no local da inflamação pode ser neurotóxico para o axônio (Rieckmann e Smith, 2001).

Tendo-se em vista o acima descrito, a resposta inflamatória no SNC tem sido usualmente aceita como a responsável pela lesão neuronal. Entretanto, estudos sugerem que as reações inflamatórias podem também ser neuroprotetoras (Hohlfeld et al., 2007; Kerschensteiner et al., 2008). Algumas citocinas como TNF α , IL-1 e IFN λ são conhecidas como citocinas pró-inflamatórias. Entretanto, estas também têm função imunossupressora e, quando secretadas após a lesão, têm a ação de reparar o processo inflamatório, sugerindo assim, uma dupla função da inflamação no SNC (Correale et al., 2004). Além disso, estudos revelam que o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) é também produzido por várias células do Sistema Imune (SI) e este é responsável pela manutenção e sobrevivência do neurônio (Kerschensteiner et al., 1999; Hohlfeld et al., 2007).

A interação entre SI e SNC é realizada pelas células da glia. Por muito tempo, acreditou-se que a interação entre SN e SI era realizada principalmente pela ação da microglia, pois a microglia além de atuar como uma molécula apresentadora de antígeno, expressar receptores Toll like receptors (TLRs), ainda tem a capacidade de apresentar moléculas co-estimulatórias às células T (Sanders et al., 2007). Entretanto, estudos, mais recentes, demonstraram que os astrócitos também podem atuar como moléculas co-estimulatórias (Nair et al., 2008) e ainda podem expressar os TLRs. Neste sentido, os astrócitos têm a capacidade de ativar as células vizinhas e amplificar a resposta imune inata local e, ainda, modificar a permeabilidade da barreira hemato-encefálica, permitindo a resposta imune adaptativa no SNC (Faina et al., 2007).

Um fato relevante demonstrado em estudos recentes é que a molécula chamada MHC I (Complexo Principal de Histocompatibilidade classe I) presente no SI também é expressa em neurônios axotomizados. Semelhantemente, as células da glia, em resposta à lesão nervosa, também expressam MHC I. Isto mostra que essa molécula tem um importante papel no processo de plasticidade sináptica e, também, na interação entre o SI e SN (Cullheim and Thams, 2007).

1.5 O papel do MHC I no Sistema Nervoso.

Em humanos a molécula do complexo MHC é codificada por genes do complexo HLA, encontrado no braço curto do cromossomo 6. Existem duas classes diferentes da molécula MHC, classe I e classe II. O MHC classe I está presente em células nucleadas e é sintetizado no retículo endoplasmático (RE). O peptídeo processado no citosol da célula,

juntamente com a molécula MHC I, é transferido para a membrana citoplasmática, podendo ser reconhecido pelo TCR da célula TCD⁸⁺. A molécula de MHC classe II tem uma distribuição mais restrita. Esta molécula é encontrada em monócitos, macrófagos, células dendríticas e células apresentadoras de antígeno (APC). A molécula MHC II também é sintetizada no RE e os peptídeos são reconhecidos pelo TCR da célula TCD⁴⁺ (Thorsby, 1999).

A função das moléculas de MHC é revelar, ao meio extracelular, amostras dos constituintes protéicos das células, sinalizando ao Sistema Imunológico que o metabolismo está normal, isto é, que as proteínas sintetizadas no interior celular são próprias dessas células. Entretanto, a molécula de MHC pode apresentar também peptídeos de microorganismos, bactérias ou vírus, dando assim início a uma resposta imune adaptativa (Thorsby, 1999).

Até recentemente estudos mostravam que os neurônios não expressavam quantidades significativas de MHC I (Lampson, 1995). Entretanto, recentemente tem-se mostrado que o MHC I é um importante mecanismo de interação entre neurônios e células da glia que diretamente afeta o processo de plasticidade e astrogliose (Oliveira et al., 2004; Thams et al., 2008; Sabha et al., 2008). Em neonatos são responsáveis, em parte, por um refinamento das sinapses no núcleo geniculado lateral, durante a maturação pós-natal das vias visuais. Em adultos, após a lesão periférica, MHC I é também importante na fase aguda após axotomia (Corriveau et al., 1998; Huh et al., 2000; Goddard et al., 2007).

Assim, em animais mutantes que não expressam de maneira funcional esta molécula, não são capazes de retrain seletivamente as sinapses dos motoneurônios medulares. Tal mutação resulta na exacerbação da eliminação dos inputs medulares, indicando uma

significante perda do potencial regenerativo (Oliveira et al., 2004). Neste sentido, a ausência na expressão de MHC I resulta na incompleta segregação dos inputs nos olhos direitos e esquerdos, causando a manutenção de conexões aberrantes que devem ser eliminadas (Huh et al., 2000). Oliveira et al, (2004) mostraram que a ausência da expressão de MHC I resultou em exacerbado destacamento dos terminais sinápticos, diminuindo o potencial regenerativo dos neurônios após lesão.

1.6 Plasticidade sináptica.

A estabilização e a manutenção dos circuitos neuronais do SNC constitui-se num processo complexo e pouco conhecido, o qual envolve milhares de neurônios interconectados precisamente através das sinapses (Huh et al., 2000; Boulanger et al., 2001). O funcionamento exato dessas conexões no SNC depende da atividade neural que desempenha a função de estabilizar ou eliminar as conexões quando necessário. Este refinamento sináptico foi observado no sistema visual de gatos, no núcleo geniculado lateral, durante o início do desenvolvimento e em fases mais tardias. Diante disso, no SNC, podemos dizer que existe a ocorrência do remodelamento estrutural e de plasticidade sináptica (Huh et al., 2000), regidos por mecanismos ainda pouco conhecidos. Da mesma forma, após uma lesão que resulte na interrupção do contato entre o motoneurônio com suas fibras musculares alvo, uma série de alterações ocorrem no corpo celular do neurônio, sendo, em conjunto, denominadas cromatólise (Romanes, 1946; Lieberman, 1971; Kreutzberg, 1982; Aldskogius and Svensson, 1993). Associado a isso, há uma retração significativa das terminações nervosas em contato com o corpo celular desses motoneurônios, sendo as excitatórias do tipo glutamatérgicas as mais afetadas. Acredita-se

que essas mudanças sejam necessárias para que haja a sobrevivência ou a reparação desses motoneurônios, uma vez que o glutamato exerce um efeito excitotóxico sobre as células nervosas (Lindå et al., 2000). É interessante ressaltar que tais alterações são visíveis tanto na lesão por axotomia intramedular quanto na indução da EAE (Lindå et al., 2000; Zhu et al., 2003; Marques et al., 2006).

1.7 Esclerose Múltipla.

Para os patologistas a EM é uma desordem do SNC manifestada por inflamação focal, aguda, desmielinizante, com perda axonal e com limitada remielinização, culminando em placas escleróticas multifocais. Para os neurologistas a EM é uma doença prevalente em jovens adultos, diagnosticada com evidências de bases clínicas e para-clínicas, afetando diferentes áreas do cérebro e da medula espinhal (Compston e Coles; 2002).

Morfológicamente, a EM manifesta-se por inflamação e desmielinização do SNC. As lesões inflamatórias são caracterizadas por significativa reatividade da macro e micróglia envolvendo a síntese de mediadores solúveis. Adicionalmente, células T e B, macrófagos, também estão intensamente envolvidos (Bruck, 2005). Esse processo inflamatório provoca lesão axonal e degeneração da mielina (Bruck, 2005; Kerschensteiner et al., 2004), desencadeando vários sintomas neurológicos e comprometimentos clínicos. (De Stefano et al., 1998; Kornek et al., 2000; Thickbroom et al., 2004).

O diagnóstico é dado a partir de critérios prévios de análises. Desse modo, o diagnóstico de imagem de Ressonância Magnética (RM) não é suficiente para diagnosticar a doença. Para obter um melhor diagnóstico, o indivíduo deve apresentar na análise de RM

mais de uma área do cérebro comprometida anatomicamente, ter sofrido no mínimo 2 surtos, apresentar déficit no teste de estímulo visual e infiltrado inflamatório no teste do líquido cérebro-espinhal (Compston e Coles; 2002).

A EM afeta 2 vezes mais mulheres que homens. Esta doença tem uma incidência de 7 por 100.000 indivíduos. A doença predominantemente afeta Norte Europeus, sendo que 80% dos pacientes apresentam doença do tipo remitente/recorrente e 20% dos pacientes, a forma progressiva, afetando a medula, o nervo óptico, o cérebro, e o cerebelo (Compston e Coles, 2002).

A evolução da EM em humanos é extremamente variável e imprevisível, não existindo nenhum sintoma ou sinal específico da doença. Assim, a EM acomete principalmente jovens entre 20 e 45 anos, raramente manifestando-se antes dos 15 ou após os 50 anos (Holoshitz et al., 1983). Por ser uma doença de caráter polimórfico, seu desenvolvimento é muito variável. O primeiro é denominado curso remitente/recorrente, mais comum no adulto jovem, onde a piora dos sinais clínicos ocorre na fase aguda da doença com incompleta recuperação dos sintomas e os sinais neurológicos são transitórios. Já o segundo é denominado curso progressivo, caracteriza-se pelo acúmulo gradual de déficits neurológicos com lenta piora clínica, sem que ocorram remissões e geralmente com comprometimento motor (sistema piramidal e/ou cerebelar) (Holoshitz et al., 1983; Carvalho et al., 2003). Ainda, além da forma remitente/recorrente e progressiva, tem-se a forma remitente com déficits residuais e a forma progressiva secundária (Joy e Johnston, 2003).

Para o tratamento da EM são utilizados os medicamentos como o acetato de glatiramer (AG) e interferon β , que atuam como agentes imunomodulatórios, diminuindo a frequência e a intensidade dos surtos da doença (Maier et al., 2006). Embora os mecanismos envolvidos não sejam ainda completamente conhecidos, sabe-se que o AG compete com os antígenos da mielina pelo ligante MHC e, por esse motivo, inibe a resposta das células T (Fridkis-Hareli et al., 1994). Além disso, o AG tem a habilidade de estimular a proliferação de células TH2 sobre TH1, suprimindo a atividade das células T (Jee et al., 2004). Já o interferon β é um neuroprotetor que atua contra a toxicidade induzida pela microglia ativada em neurônios corticais. Desse modo, o interferon β inibe a produção de glutamato e superóxido (Jin et al., 2007).

1.8 Encefalomielite Autoimune Experimental.

Um modelo para o estudo da EM é denominado EAE, cuja investigação, como modelo animal, tem sido de grande utilidade, pois é possível observar degeneração axonal similar a observada em humanos com EM (Kornek et al., 2000). A indução da EAE pode ser passiva ou ativa. A forma ativa baseia-se na imunização de ratos ou camundongos com baixas doses de proteína básica de mielina (MBP), proteolipoproteína (PLP) ou glicoproteína da mielina de oligodendrócitos (MOG), administradas em conjunto com um adjuvante apropriado (Teixeira et al., 2005; Hofstetter et al., 2006). Já a forma passiva é a transferência de linfócitos ou células T encefalitogênicas ativadas de animais sensibilizados (Teixeira et al., 2005).

A MOG usada na indução ativa pertence à família das imunoglobulinas e está expressa na mielina do SNC, ou seja, na superfície extracelular de oligodendrócitos e da bainha de mielina (Bernard et al., 1997). A MOG é capaz de induzir uma resposta autoimune de células T e B, levando à desmielinização (Olsson et al., 2000). Embora, o SNC seja isolado por uma barreira endotelial, a barreira hematoencefálica é sujeita à invasão de células T, que provocam uma resposta autoimune no local de migração (Hofstetter et al., 2006; Serpe et al., 1999). Além da invasão de células T, há também a produção de quimiocinas que desencadeiam afluxo de monócitos. Secundariamente há o aumento da produção e liberação de substâncias neurotóxicas tais como óxido nítrico e agonistas de glutamato, tanto por parte da microglia residente quanto por parte dos macrófagos derivados de monócitos (Hammarberg et al., 2000). A microglia ativada secreta fatores citotóxicos como a interleucina-1 e o fator de necrose tumoral (TNF), que induzem a degeneração neural (Srinivasan et al., 2004). Esses eventos levam à destruição de mielina e das células produtoras de mielina. Assim, na fase inicial da doença, a lesão é detectada por um acúmulo de proteína precursora de amilóides (APP) e por um edema na via axonal (Bruck, 2005).

A doença pode se apresentar de forma aguda monofásica ou crônica com surtos e remissões, dependendo do animal utilizado. A resposta para cada epítipo encefalitogênico depende da população de receptores das células T e do MHC II. Assim, cada espécie de animal oferece aspectos particulares para o estudo da doença (Teixeira et al., 2005). Os ratos Lewis desenvolvem a forma aguda e monofásica da doença, enquanto os camundongos desenvolvem preferencialmente a forma crônica. Na EAE observa-se uma instalação ascendente que inicia com os sinais clínicos: hipotonia distal da cauda evoluindo

rapidamente para uma paraplegia completa com hipoestesia das patas dianteiras e incontinência. Após um platô de 2 a 3 dias, os sinais clínicos desaparecem espontânea e progressivamente. O quadro clínico completo evolui em 20 dias. Na transferência passiva de linfócitos auto-reativos, o quadro clínico evolui em uma semana (Lider et al., 1989). A EAE, induzida em ratos, reproduz clinicamente um episódio de exacerbação da EM e uma melhora relativamente rápida sendo evidenciada do 3° ao 5° dia do período de remissão (Zhu et al., 2003). No caso da EAE em camundongos, os primeiros sintomas da doença são visíveis entre 9 a 14 dias após a imunização com MOG (Stromnes e Goverman, 2004).

1.9 Mecanismos da doença na EM.

Na EM, a perda axonal inicia-se antes do surgimento dos primeiros sinais clínicos, sendo assim, difícil a detecção e a prevenção da doença (De Stefano et al., 1998). Associado a essa morte axonal, a infiltração de células inflamatórias no sistema nervoso e a retração de terminais nervosos são eventos relevantes durante o surto e a remissão. Desse modo, é de grande importância para o melhor entendimento da fisiopatologia da EM, o estudo cuidadoso das sinapses em aposição ao corpo celular e dendritos proximais de motoneurônios alfa medulares durante o surto e remissão.

Somado a isso, o processo de remielinização após os episódios agudos é importante para a recuperação neurológica e funcional da doença. Foi observado que as células do sistema imune, paradoxalmente têm a função de reorganizar a mielina e diminuir o processo inflamatório. Assim, estas células podem liberar citocinas semelhantes às interleucinas 4 e fatores neurotróficos que atenuam a atividade fagocitária dos macrófagos e

também podem promover a atividade de remielinização. Entretanto, a remielinização é, geralmente, incompleta, pois é caracterizada por uma fina bainha de mielina, contribuindo para que a interação com o correspondente neurônio não seja restaurada inteiramente (Bruck, 2005).

Em modelos de EAE, o processo inflamatório autoimune mostrou uma ação acumulativa da lesão nos axônios. Assim, no início da doença, os déficits podem ser compensados por dois mecanismos: a presença de fibras ainda não lesionadas nos tractos e a formação de desvios nos circuitos. Entretanto, as sucessivas lesões e o progresso da doença, poderão esgotar o potencial destes mecanismos. Logo, os recorrentes surtos prejudicam o processo de recuperação da lesão (Kerschensteiner et al., 2004).

Trabalhos indicam que o efeito neurotrófico e plástico acima descrito esteja relacionado à interação entre os neurônios e os linfócitos (Hammarberg et al, 2000). As células T reagem com os antígenos da substância branca do SNC, tal como, a MBP. Os fatores de crescimento secretados pelas células T anti-MBP no tecido podem proteger o SNC de lesões. Assim, os fatores de crescimento podem atenuar a elevação do nível de Ca^{++} e radicais livres, responsáveis pela lesão neuronal (Moalem et al, 1999). Além disso, sabe-se que os três fatores neurotróficos principais, responsáveis pela reparação dos motoneurônios *in vivo* e *in vitro* são: NT-3, BDNF e GDNF. Estes fatores estão altamente expressos no tecido nervoso periférico. Já no SNC, estão relativamente em menores quantidades. Observou-se que os fatores neurotróficos não são expressos em locais onde a ativação glial está relativamente alta. Isto está de acordo com o conceito geral de que o tecido nervoso no SNC tem uma baixa capacidade de regeneração. Entretanto, as células T

e NK ou (NK-T) presentes no SNC durante a EAE, promovem um alto nível de fatores neurotróficos (Hammarberg et al., 2000).

Outros estudos mostram que, durante a degeneração do axônio, há uma ativação de astrócitos e microglia. Estes cooperam para promover a eliminação dos terminais sinápticos. Sendo a microglia responsável pela remoção dos terminais nos períodos iniciais da lesão e os astrócitos presentes nos períodos mais tardios. Porém, há controvérsias quanto ao período de ação das células gliais, pois estudos empregando animais com bloqueio da resposta microglial também tiveram, nos períodos iniciais, seus terminais retraídos. Neste caso, os astrócitos podem ter sido os responsáveis pela reorganização dos terminais sinápticos (Aldskogius e Svensson. 1999). Segundo Cullheim e Thams (2007), a microglia tem o papel de desligar, fisicamente, os terminais pré sinápticos do motoneurônio após lesão axonal. Esse desligamento tem a função de promover a sobrevivência neuronal, por impedir eventos de excitotoxicidade.

A partir desses resultados, fica evidente a existência de um paradoxo no que diz respeito aos efeitos de um processo inflamatório no SNC. Por um lado, o afluxo de linfócitos e macrófagos resulta num aumento dos níveis de radicais livres, citocinas, bem como agonistas de glutamato, associados ao processo desmielinizante (Hammarberg et al., 2000). Por outro lado, esses mesmos elementos celulares produzem moléculas neurotróficas potencialmente capazes de proteger os neurônios, reduzindo assim a perda neuronal (Moalem et al., 1999). Associado a esses fatos, existe a expressão do MHC I que pode ser um mecanismo importante no processo de retração e remodelação dos circuitos medulares durante a EAE. É possível que esses três eventos estejam relacionados, porém desconhecemos essa interação e a sua influência na reparação neuronal.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais.

Os objetivos deste estudo são analisar, através de técnicas de imunoistoquímica e microscopia eletrônica de transmissão, a dinâmica das sinapses em aposição ao corpo celular e aos dendritos proximais de motoneurônios alfa medulares durante o surto, a remissão e nos episódios recidivantes e remitentes dos camundongos após a indução a EAE. Além disso, investigar a influência do processo inflamatório, na preservação e ou na retração de terminações nervosas ao corpo celular de motoneurônios alfa.

2.2 Objetivos específicos.

- Analisar a densidade sináptica no microambiente dos motoneurônios alfa, com a expressão de sinaptofisina.
- Analisar a astrogliose reativa nas adjacências dos motoneurônios com a expressão de GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein).
- Analisar a expressão do MHC I nas adjacências dos motoneurônios através de imunoistoquímica.
- Analisar a reatividade da microglia nas adjacências dos motoneurônios através de imunoistoquímica.
- Analisar a disposição e comportamento das aferências dos motoneurônios alfa medulares na intumescência lombar, através da microscopia eletrônica de transmissão.

3. MATERIAS E MÉTODOS

3.1 Grupos experimentais.

Foram utilizados 40 camundongos C57BL/6J (20-25g), fêmeas com 7 semanas, obtidas do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas. Os animais foram agrupados em gaiolas plásticas, com livre acesso à ração e água *ad libitum*, com controle de luminosidade (ciclo claro/escuro de 12h) e à temperatura de 21°C. Os experimentos foram conduzidos seguindo-se as normas de ética na experimentação animal. (CEEA; protocolo nº 991-1)

Os animais foram divididos em 4 grupos com 10 animais cada: 1- controle, 2- surto (19º dia após imunização), 3- 1ª remissão (30º dia após imunização) e 4- 2ª remissão (40º dia após a imunização). Em cada grupo, 5 animais foram submetidos à análise por imunoistoquímica e 5 à análise por microscopia eletrônica de transmissão.

Para todos os animais dos grupos surto, 1ª remissão e 2ª remissão foram selecionados para análise apenas os animais que atingiram grau 3 ou 4 da doença. Foram descartados os animais que atingiram apenas grau 2.

3.2 Indução da EAE.

Os camundongos foram induzidos à EAE por meio de aplicações de 100µl no plexo braquial direito e esquerdo de cada animal, do peptídeo de MOG₃₅₋₅₅ diluído em PBS e *Mycobacterium tuberculosis* (1,5 mg/ml; Difco) emulsificada com adjuvante completo de Freund.

Os camundongos foram examinados diariamente para a identificação de sinais neurológicos da doença. Os sintomas da EAE foram graduados de acordo com Stromnes e Goverman(2004), com a seguinte escala: grau 0 (sem sinais clínicos), grau 1 (flacidez da cauda), grau 2 (paralisia parcial dos membros posteriores), grau 3 (paralisia completa dos membros posteriores e parcial dos anteriores) e grau 4 (paralisia total do animal), como mostra a figura que se segue:

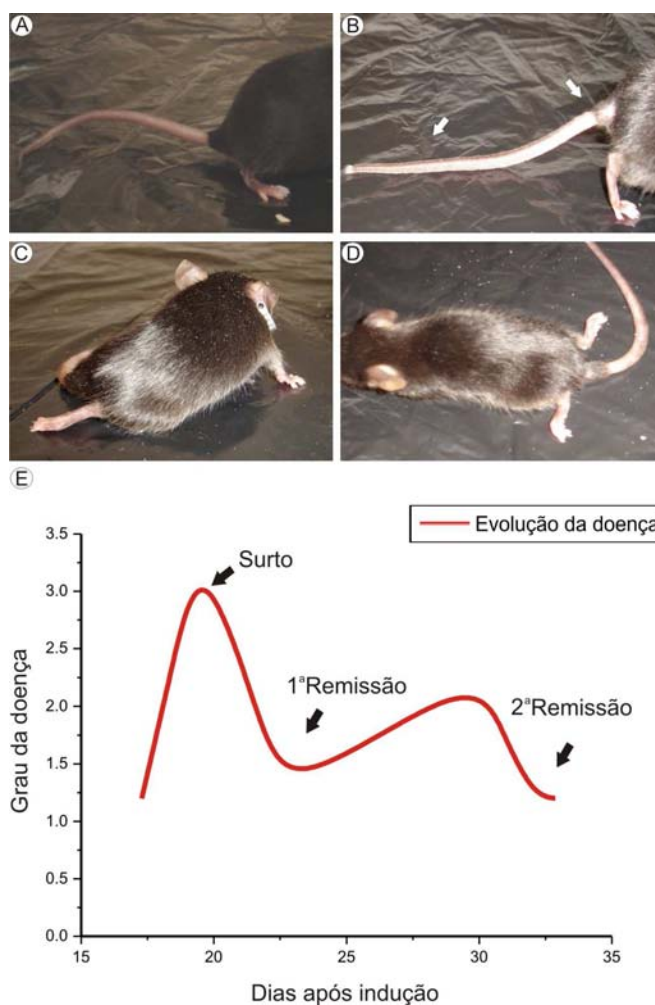


Figura 1. Camundongos submetidos à EAE e graduação típica dos sinais clínicos da doença: A- Grau 0 ausência de sinais clínicos, B- Grau 1 flacidez da cauda (seta). C- Grau 2 paralisia parcial dos membros posteriores, D- Grau 3 paralisia completa dos membros posteriores e parcial dos membros anteriores. E- Gráfico representando o curso da doença típica de animais submetidos à doença.

3.3 Sacrifício dos animais e processamento para imunoistoquímica.

Após os períodos de sobrevivência pré-determinados, os animais foram sacrificados. Para isso, estes foram primeiramente anestesiados com a combinação de Kensol (xylasin, 5mg/Kg) e Vetaset (ketamin, 100mg/Kg) e em seguida submetidos à toracotomia. Visando a lavagem total dos vasos e órgãos, foram perfundidos transcardiacamente com auxílio de uma seringa contendo 20ml de solução de salina (NaCl 0,9% em tampão fosfato de sódio, pH 7,38). Para a fixação foi realizada a perfusão de 20ml de uma solução contendo formalina (10%) em tampão fosfato de sódio, pH 7,38.

Posteriormente à fixação, os espécimes foram dissecados e mantidos em fixador por 12 horas a uma temperatura de 4°C. Passado este período, as medulas e raízes nervosas foram incluídas em Tissue-Tek (Miles Inc., USA) e congeladas em n-Hexano à -35 a -40°C em recipiente contendo nitrogênio líquido. Cortes histológicos com 12µm de espessura foram obtidos em criostato. As secções foram então transferidas para lâminas silanizadas e estocadas a -20°C até a realização das imunomarcações.

Para a realização da imunoistoquímica, as lâminas climatizadas foram lavadas 3 vezes por 5 minutos em TBS 5% Tween, sendo posteriormente bloqueadas com TBS 5% Tween a 3% BSA por 60 minutos. Após este período as lâminas foram incubadas em câmara úmida com 50µl de anticorpo primários e TBS 5% Tween a 1% BSA por 3 horas. Os anticorpos primários utilizados foram: anti-sinaptofisina (diluição 1:100), anti-GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) 1:100, anti- IBA-1 1:500 e anti- MHC I 1:100. A seguir as secções foram lavadas 3 vezes por 5 minutos em TBS 5% Tween. Em sequência à primeira incubação, as lâminas foram incubadas com os anticorpos secundários (1:200) conjugados

com cianina 2 (CY-2) ou 3(CY-3) (Jackson Lab., USA) por 45 minutos. Os espécimes foram lavados em TBS 5% Tween e montados em glicerol/PBS 0,01M (3:1) e observados em microscópio de fluorescência utilizando-se os filtros para fluoresceína (CY-2) e rodamina (CY-3).

3.3.1 Análise quantitativa da imunoistoquímica.

As imunomarcações com anti-sinaptofisina, anti-GFAP, anti- IBA 1 e anti-MHC I foram observadas e documentadas com o microscópio de fluorescência invertido (NIKON-ECLIPSE T100) conectado a um sistema de aquisição de imagens (câmera Nikon e software Metamorph)

Para a quantificação, foram selecionadas três imagens representativas de cada animal de todos os grupos. Para cada lâmina foram medidas 12 regiões adjacentes aos motoneuônios localizados no corno anterior da medula espinal, obtendo-se a densidade integrada de pixels, que representa a intensidade da imunomarcação, de acordo com Oliveira et al., (2004), utilizando-se o software IMAGEJ (versão 1.33u, National Institutes of Health, USA). A densidade integrada de pixels foi calculada para cada animal e então estabelecida a média para cada grupo $\pm$ erro padrão.

3.3.2 Análise estatística em imunoistoquímica

A partir dos valores obtidos, a média e o erro padrão em cada grupo experimental foram calculados. As eventuais diferenças entre os grupos experimentais foram analisadas

pela ANOVA e posteriormente pelo Teste T –Student para dados paramétricos e Mann-Whitney para dados não-paramétricos, assumindo-se $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***)).

3.4 Sacrifício dos animais e processamento dos espécimes para microscopia eletrônica.

Após anestesia com Kensol (xilazine, 5mg/Kg) e Vetaset (cetamina, 100 mg/Kg) os animais foram submetidos à toracotomia e perfundidos transcardiacamente com auxílio de uma seringa. Inicialmente, visando a lavagem total dos vasos e órgãos, os animais foram perfundidos com 20ml de uma solução salina tamponada e heparinizada (NaCl 0,9% em tampão fosfato de sódio, pH 7,38). A fixação foi realizada pela subsequente perfusão de 20ml de uma solução contendo glutaraldeído (2%) e paraformaldeído (1%) em tampão fosfato de sódio, pH 7,38.

Após fixação, o conjunto contendo a intumescência lombar e raízes nervosas foi dissecado e imerso na mesma solução fixadora por 12 horas, mantidos a uma temperatura de 4°C. Passado esse período, os elementos do referido conjunto foram lavados em tampão fosfato 0,1M e dissecados sob lupa, sendo a medula espinhal reduzida de forma que se obteve fragmentos correspondentes aos lados ipsilateral e contra-lateral. Os fragmentos foram colocados individualmente em frascos contendo tampão fosfato de sódio, pH 7,38. Estes foram então pós-fixados por um período de 2 horas em solução de tetróxido de ósmio a 1%, diluído em tampão fosfato de sódio 0,2M pH 7,38. Seguindo-se à pós-fixação, os fragmentos foram desidratados em série crescente de acetona e incluídos em resina (Durcupan, Sigma). Os blocos foram desbastados e secções semi-finas (0,5µm) obtidas e

coradas com azul de toluidina 0,25% para a observação ao microscópio óptico. A seguir, algumas regiões foi selecionadas e os blocos retrimados sendo realizados os cortes ultra-finos (500Å; ultramicrotomo LKB, Bromma 8800) os quais serão coletados em telas de cobre com película de formivar diluído em dicloroetano. Após contraste em acetato de uranila 5% em solução aquosa por 30 minutos as telas de cobre foram lavadas em água destilada e em seguida contrastadas em citrato de chumbo, por mais 5 minutos. Os espécimes foram observados ao microscópio eletrônico de transmissão, operando a 60KV.

3.4.1 Análise das secções ultra-finas.

Neurônios com grandes corpos celulares (>35 µm em diâmetro), encontrados no grupo dorso-lateral da coluna anterior da medula e seccionados ao nível do plano nuclear foram identificados como α -motoneurônios pela presença de terminais nervosos do tipo C. Os neurônios foram identificados como lesionados baseando-se na ocorrência de modificações cromatolíticas no corpo celular e a superfície das células foi então digitalizada em um aumento de 10.000×, sendo montada sequencialmente em programa vetorial, como mostra o exemplo que se segue:

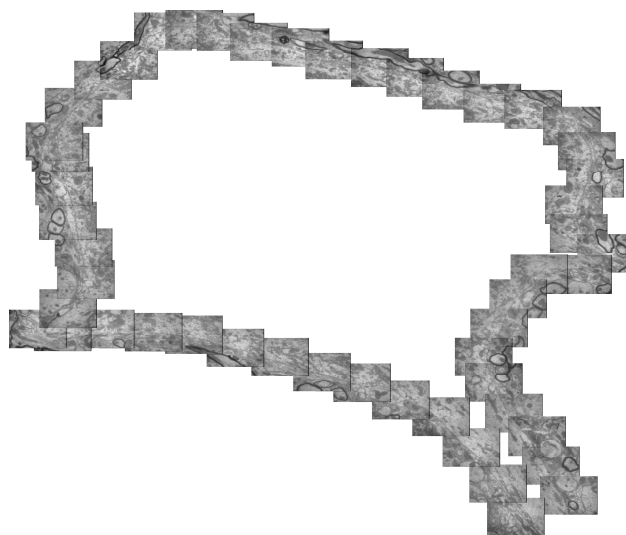


Figura 2. Seqüência de fotomicrografias eletrônicas de transmissão utilizada para reconstrução de um motoneurônio alfa.

3.4.2 Quantificação em microscopia eletrônica de transmissão.

Após montados os motoneurônios em programa vetorial, os terminais sinápticos em contato com o corpo celular foram identificados em: F (com as vesículas achatadas), S (com vesículas esféricas) e C (com uma cisterna sub-sináptica), de acordo com a nomenclatura de Conradi (1969) e conforme Fig. 3. Após identificação dos terminais foi quantificada a cobertura sináptica destes. Além disso, foi quantificada a distância entre os terminais nervosos que cobrem os motoneurônios (distribuição dos GAPS). Um total de 40 motoneurônios foram estudados (dois para cada animal) em 4 grupos de 5 animais (grupo controle, grupo surto, grupo 1ª remissão e grupo 2ª remissão).

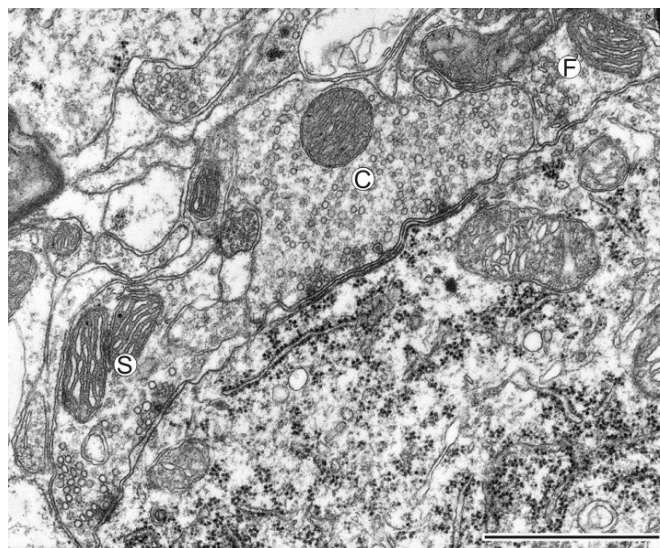


Figura 3. Fotomicrografia mostrando os três tipos de terminais pré-sinápticos (S, C e F) em aposição à membrana de um motoneurônio alfa medular. Escala = 2 μ m.

3.4.3 Análise estatística em microscopia eletrônica de transmissão.

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão. A análise de eventuais diferenças intergrupos durante os episódios de surto e remissão foram realizada pela Anova, seguida pelo teste t –Student para dados paramétricos e teste Mann- Whitney para dados não paramétricos. Em todas as análises foi considerada uma significância mínima de $p < 0,05$. Assumindo-se $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***)

4. RESULTADOS

4.1 Aumento da expressão de MHC I em EAE.

A expressão do MHC I foi quantificada por meio de imunistoquímica na região do corno anterior da medula. A Fig 4 A-D mostra elevada expressão de MHC I durante o surto da doença em comparação ao grupo normal. Tal aumento foi mantido na 1^a remissão. Entretanto, houve diminuição da expressão na 2^a remissão (surto- $12,32 \pm 1,1$, 1^a remissão- $11,64 \pm 1,22$, 2^a remissão- $6,47 \pm 1,59$; n=5 para todos os grupos; média da intensidade integrada de pixels/intensidade da imunomarcacão $\pm$ erro padrão, Fig. 4E).

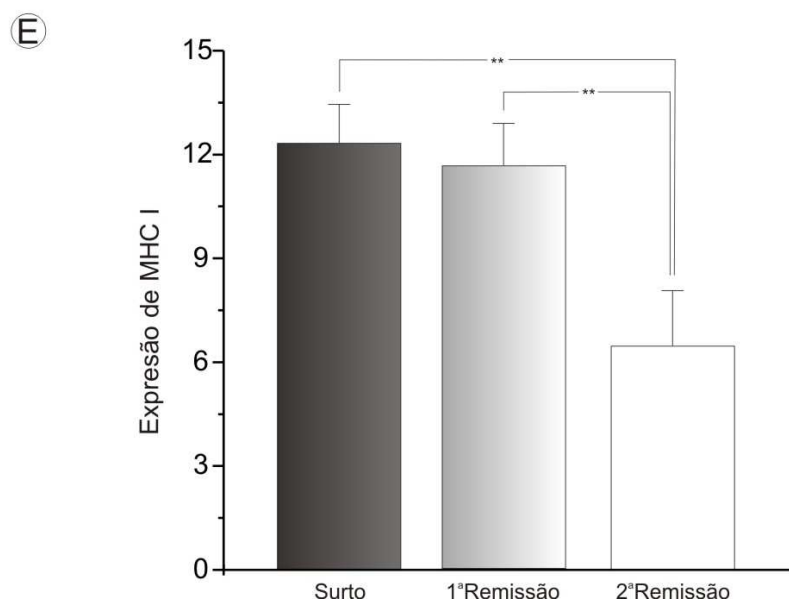
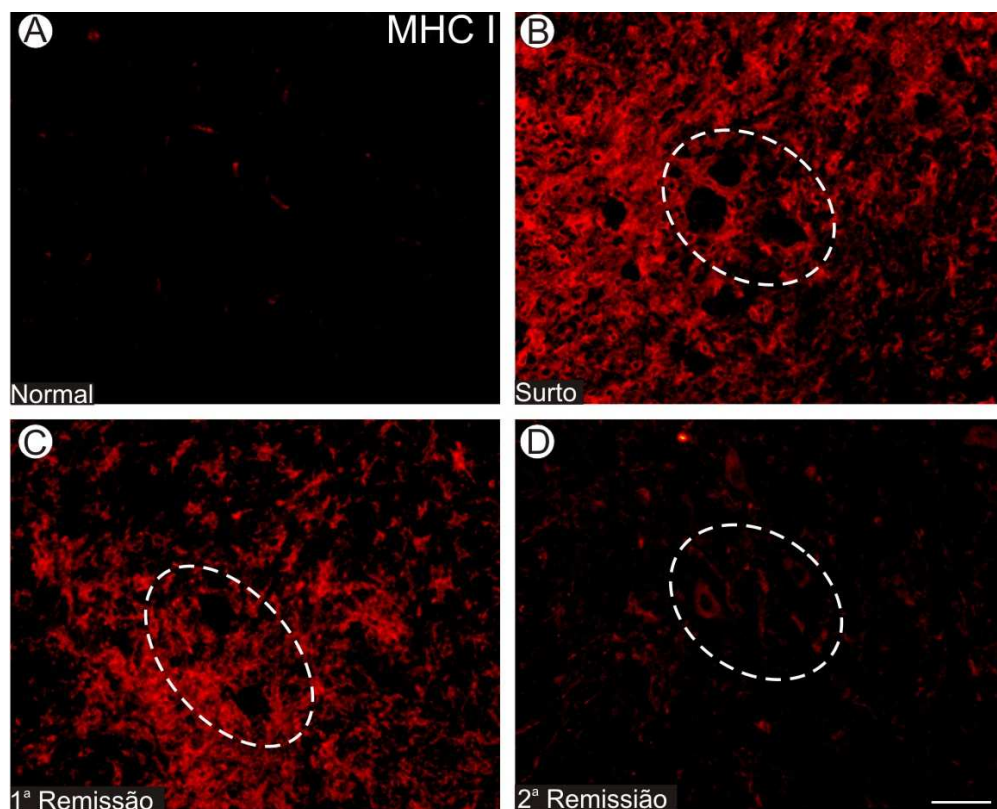


Figura 4. Expressão de MHC I no corno anterior da medula de animais C57Bl/6. Normal (A), surto grau3 da EAE (B), 1ª remissão (C) e 2ª remissão (D). Note a ausência da expressão de MHC I no grupo normal e aumento da expressão em outros grupos, especialmente no grupo surto. A quantificação da densidade em pixels em cada grupo é quantificada no gráfico (E). Círculo em pontilhado representa a região dos neurônios motores. Barra de escala=20µm.

4.2 Redução da expressão de sinaptofisina no curso da EAE.

Os resultados da imunomarcacão estão representados na Fig. 5 A-D e a análise quantitativa revelou diminuic o estatisticamente significativa em animais surto- grau 3, correspondendo ao período de paraplegia (normal- 16.92 ± 0.28 , surto- 7.54 ± 0.48 , 1^a remissão - 14.66 ± 0.51 , 2^a remissão - 12.50 ± 1.00 , n=5 para todos os grupos; média da intensidade integrada de pixels/intensidade da imunomarcacão $\pm$ erro padrão, Fig. 5E). Na 1^a remissão houve recupera o parcial da expressão de sinaptofisina, correspondendo na melhora dos sinais clínicos, apesar de não ter alcançado os níveis normais. Já na 2^a remissão mostrou diminuic o da expressão de sinaptofisina, indicando menor recupera o dos inputs.

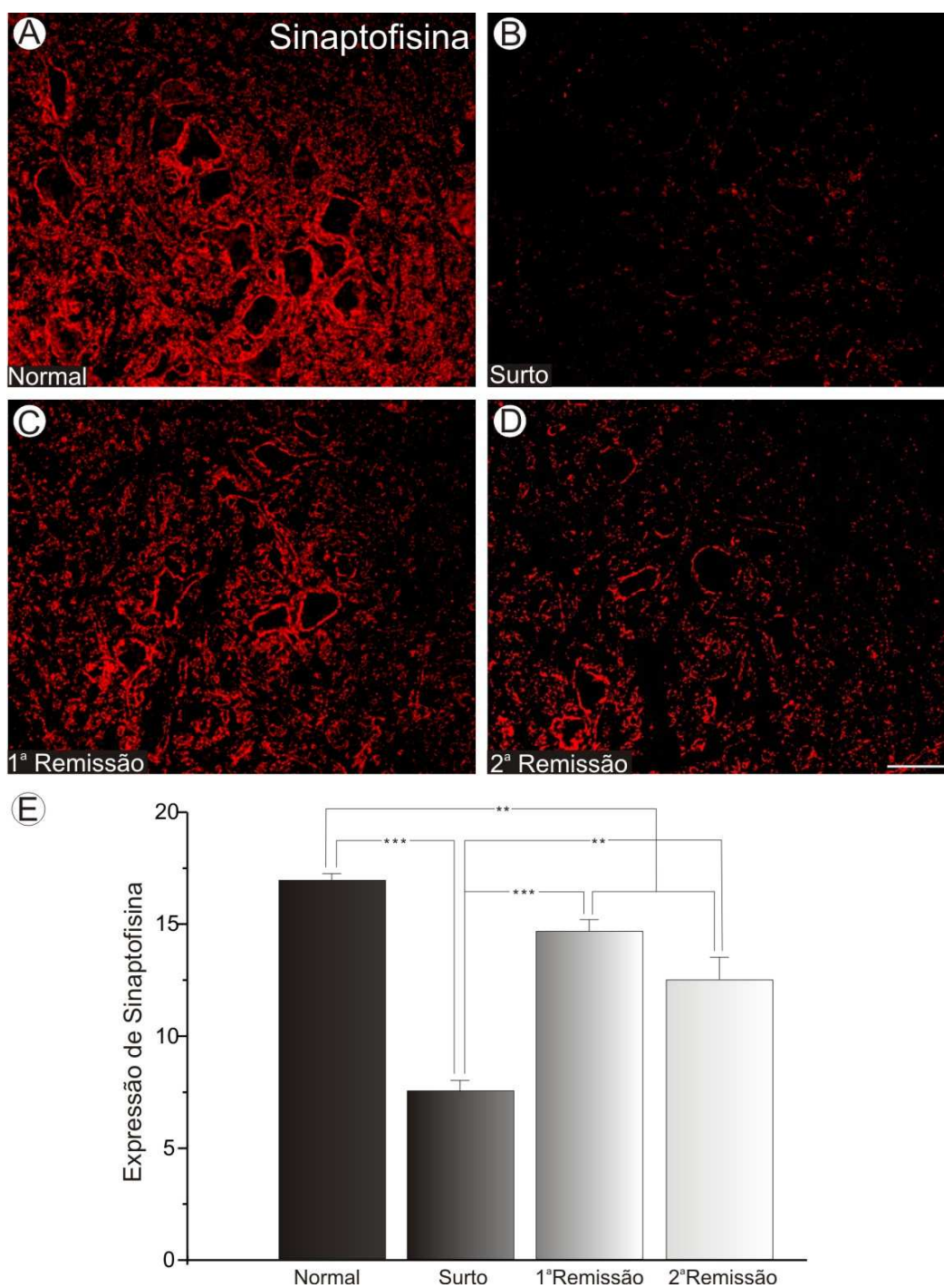


Figura 5. Expressão de sinaptofisina no corno anterior da medula de animais C57BL/6 em normal (A), surto grau 3 da EAE (B), 1ª remissão (C) e 2ª remissão (D). Observe diminuição da expressão no surto, indicando diminuição da cobertura sináptica na superfície dos motoneurônios durante o pico da doença. Note que a cobertura sináptica é parcialmente recuperada nos estágios. O gráfico representa a quantificação da imunomarcação (E). Barra de escala=20 μ m.

4.3 Aumento da reatividade glial em EAE.

A reatividade glial durante o curso da doença foi obtida por meio da imunomarcacão com os anticorpos GFAP e IBA1. Assim, houve aumento significativo em ambos astrócitos (Fig.6- normal- 6.68 ± 0.85 , 9.87 ± 0.61 , 1ª remissão- 12.68 ± 1.35 , 2ª remissão- 10.04 ± 1.15 , $n=5$ para todos os grupos; média da intensidade integrada de pixels/intensidade da imunomarcacão $\pm$ erro padrão, Fig. 6E) e microglia (Fig.7 –controle- 1.86 ± 0.28 , surto- 5.40 ± 0.57 , 1ª remissão- 4.20 ± 0.44 , 2ª remissão- 5.54 ± 0.45 , $n=5$ para todos os grupos; média da intensidade integrada de pixels/intensidade da imunomarcacão $\pm$ erro padrão, Fig. 7E) foi observado especialmente na área dos motoneurônios alfa medulares.

Durante a 2ª remissão, foi observada diminuição da astrogliose reativa. Entretanto, a reatividade da microglia manteve elevada durante o curso da doença.

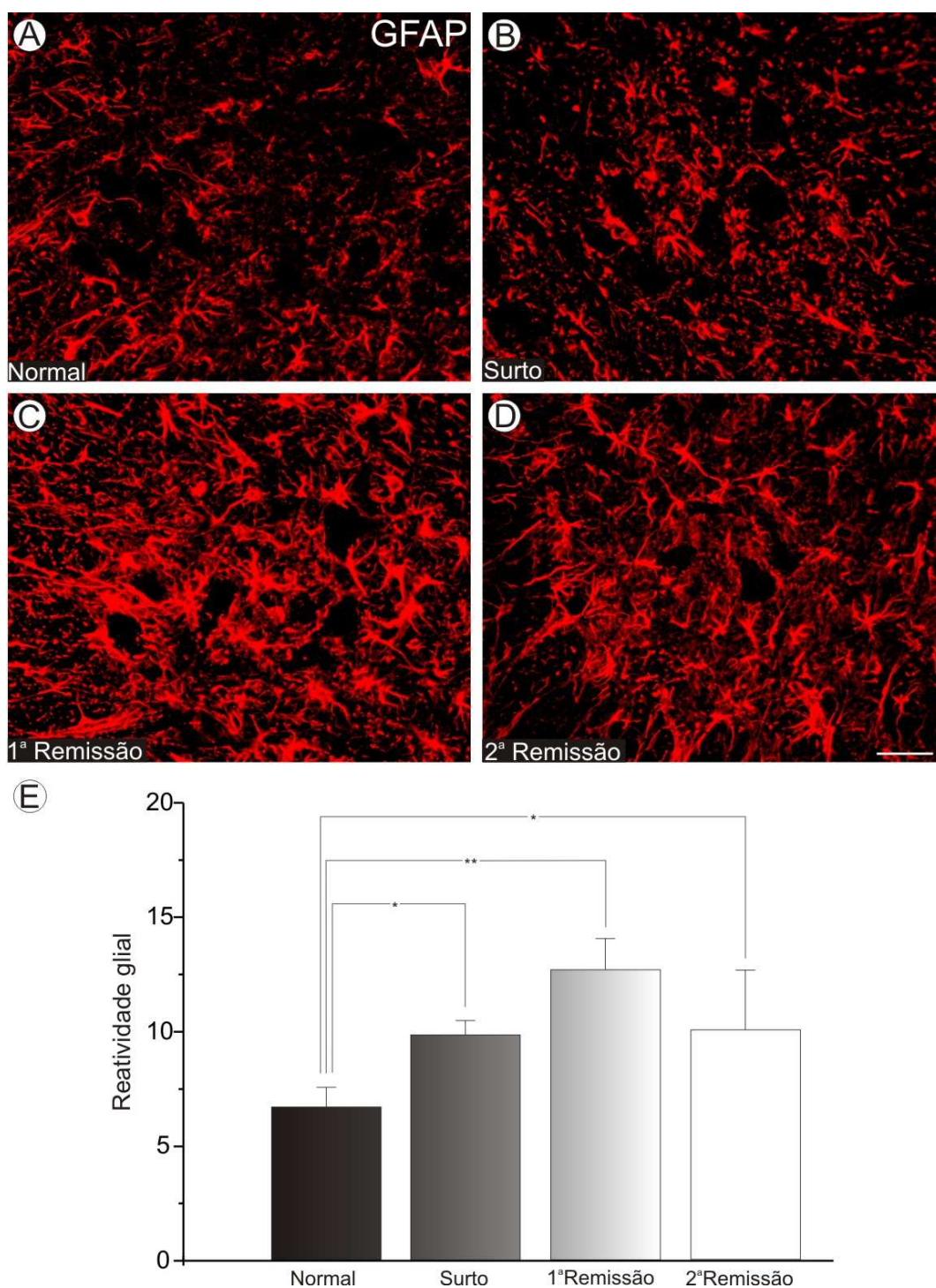


Figura 6. Reatividade glial no corno anterior da medula espinhal de C57BL/6 em normal (A), surto grau3 de EAE (B), 1ª remissão (C) e 2ª remissão (D). Observe aumento da expressão durante o pico da doença no processo de plasticidade sináptica. O gráfico representa a quantificação da imunomarcagem em todos os grupos (E). Barra de escala= 20µm.

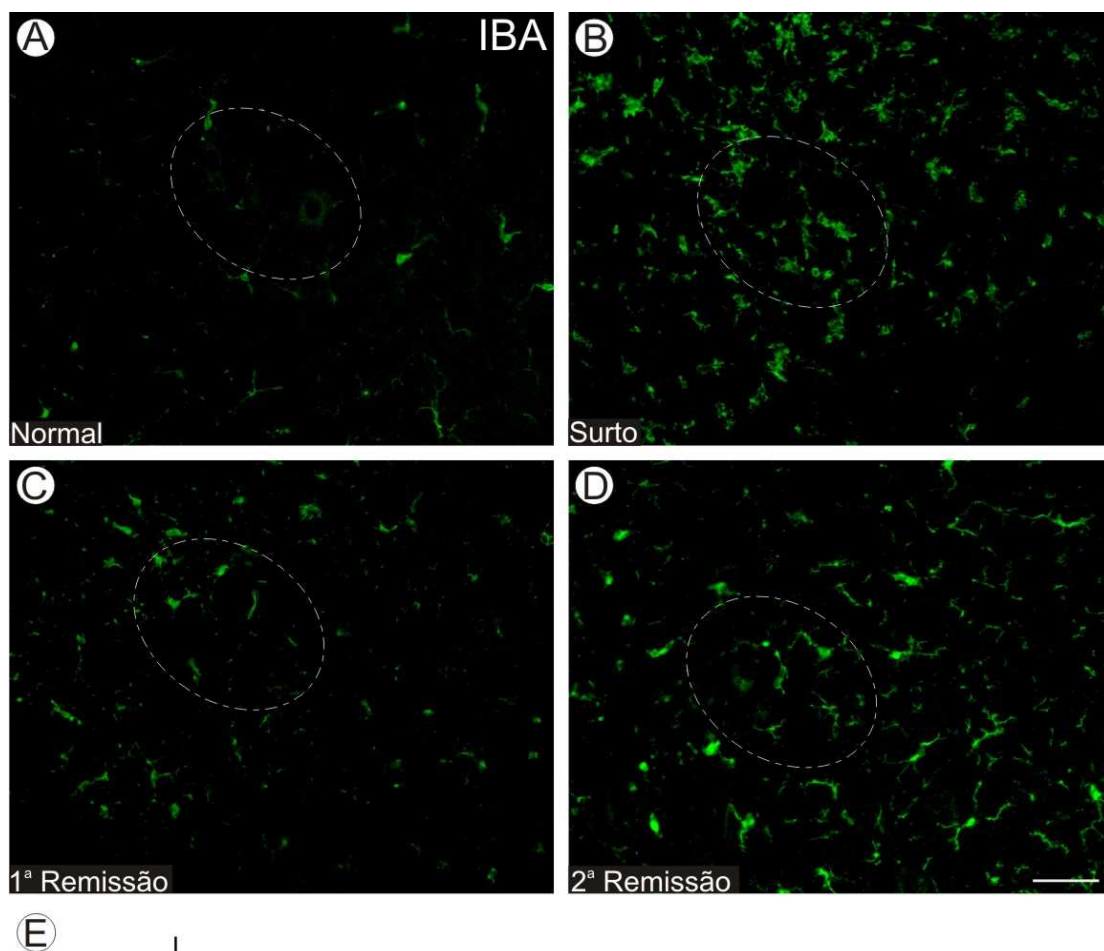


Figura 7. Expressão de IBA1 no corno anterior da medula de C57BL/6 em normal (A), surto (B), 1ª remissão (C) e 2ª remissão (D). Observe aumento da expressão durante o pico da doença que é mantido durante os estágios de remissão. O gráfico representa a quantificação da imunomarcagem de todos os grupos (E). Círculo em pontilhado representa a região dos neurônios motores. Barra de escala= 20µm.

A Figura 8 representa a correlação entre a imunomarcação e os sinais clínicos obtidos durante o curso da doença. Desse modo, o surto ocorreu por volta do 15^o dia após a imunização. O grau máximo da perda sináptica corresponde com o pico da expressão de MHCI tanto quanto com o aumento da astrogliose reativa. Entretanto, durante a primeira remissão, o aumento dos sinais clínicos está paralelo á alta regulação de GFAP. Durante a 2^a remissão, a expressão de sinaptofisina mostrou uma significativa diminuição comparada a 1^a remissão, que corresponde a piora dos sinais clínicos tanto quanto a diminuição da expressão de MHC I.

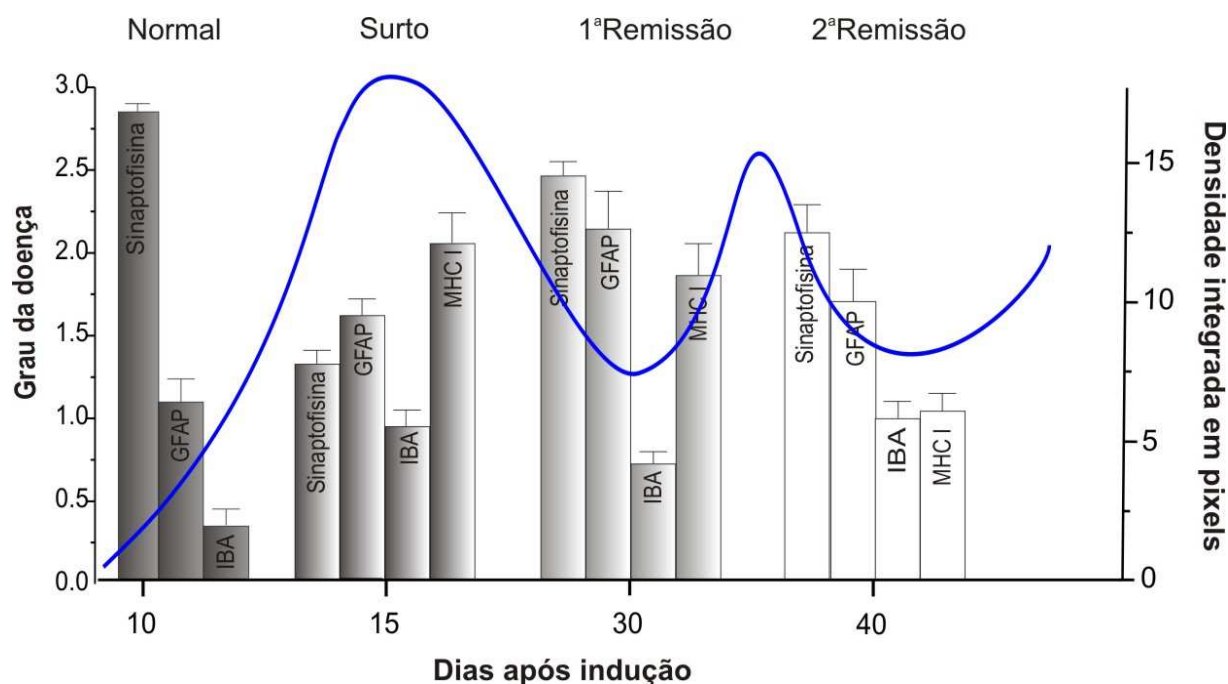
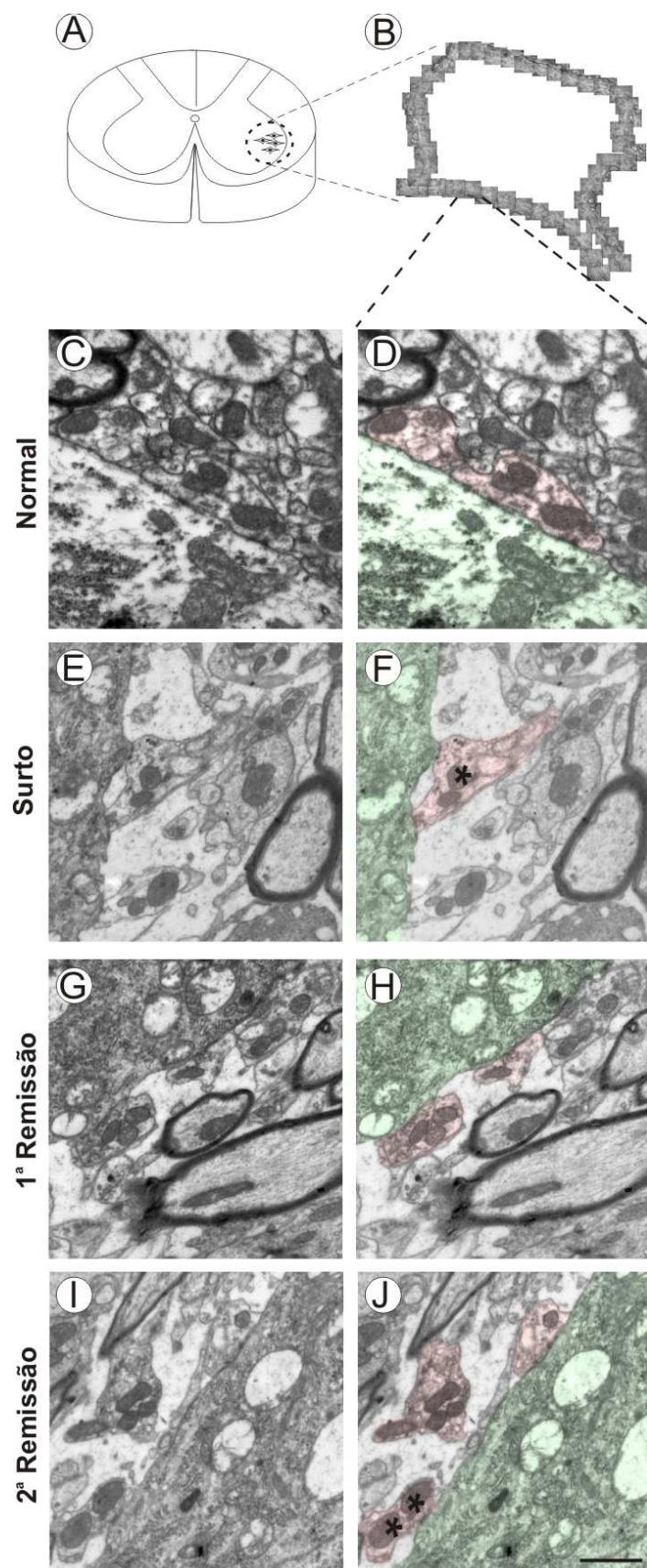


Figura 8. Gráfico representando a correlação entre a imunomarcação em diferentes estágios da doença. Note que a expressão do MHC I é maior nos estágios que a plasticidade está presente. A diminuição da expressão de MHC I durante a 2^a remissão possivelmente indica a diminuição da resposta à lesão.

4.4 Análise ultra-estrutural do aumento da eliminação sináptica durante a EAE.

Mudanças sinápticas são observadas na análise ultra-estrutural durante o curso da doença. Um total de 40 motoneurônios alfa (n=10 neurônios por grupo, 2 por animal em 4 grupos de 5 animais, nomeados em normal, surto, 1^a remissão e 2^a remissão) são analisados em relação a cobertura sináptica, tanto quanto o número, tipo de sinapses (terminal-F, representando terminal inibitório, terminal S, representando terminais excitatórios e terminais C, representando terminais colinérgicos) em aposição ao corpo da célula. Figura 9 mostra o processo de retração que ocorre durante o curso da doença.

Figura 9. A: Desenho esquemático da secção transversa no nível da medula lombar de animais C57BL/6, mostrando a região dorsolateral do motoneurônio que foi usada para análise ultra-estrutural. B: representa a reconstrução ultra-estrutural no motoneurônio alfa medular. A superfície da célula foi mapeada em um aumento de 10.000X por fotografias sequenciais. C: terminais normais na superfície dos motoneuronios alfa. D: terminais coloridos em rosa e citoplasma do motoneurônio em verde. E: exemplo de grau 3 (surto). Note a retração dos terminais da superfície dos motoneurônios. F: terminais coloridos em rosa e citoplasma do motoneurônio em verde. *= terminal pré-sináptico retraído. G: exemplo representativo da 1ª remissão mostrando reaposição dos terminais. H: terminais coloridos em rosa e citoplasma do motoneurônio em verde. I: exemplo da 2ª remissão, mostrando recuperação parcial da aposição dos terminais. J: terminais coloridos em rosa e citoplasma do motoneurônio em verde. **= terminal parcialmente retraído. Barra de escala =1 μ m.



Resultados

Redução estatisticamente significativa em terminais F (normal- $44.40 \pm 0.04\%$, Surto- 30.23 ± 0.01 , Fig. 10A) ocorre durante o pico da doença, resultando em diminuição de $\sim 47\%$ na cobertura sináptica. Esta perda dos terminais é parcialmente recuperada na 1ª remissão resultando em aumento de $\sim 39\%$ na cobertura sináptica. Entretanto, a recuperação na 2ª remissão é pior comparada a 1ª remissão (1ª remissão, $41.99 \pm 0.36\%$; 2ª remissão, $30.51 \pm 0.03\%$; Fig. 10-A)

A figura 10-B mostra que o número de terminais F e S diminui durante o surto da doença. Tal perda foi parcialmente recuperada nos estágios seguintes da doença, ou seja, a cobertura normal não foi alcançada. Além disso, na 2ª remissão, houve aumento de terminais excitatórios, indicando um desbalanço entre sinapses inibitórias/excitatórias.

Observa-se no curso da doença diminuição da cobertura sináptica decorrente a aposição parcial dos terminais. Isto é observado na Figura 10-C e indica que após a 2ª remissão; a recuperação dos inputs é incompleta, uma vez que parcela significativa dos terminais pré-sinápticos mostrou menor superfície de contato com a membrana do motoneurônio. (normal – $4.74\% \pm 1.34$, surto- $30.26\% \pm 8.14$, 1ª remissão- $11.00\% \pm 4.33$, 2ª remissão - 24.33 ± 4.28 , $n=5$ para todos os grupos).

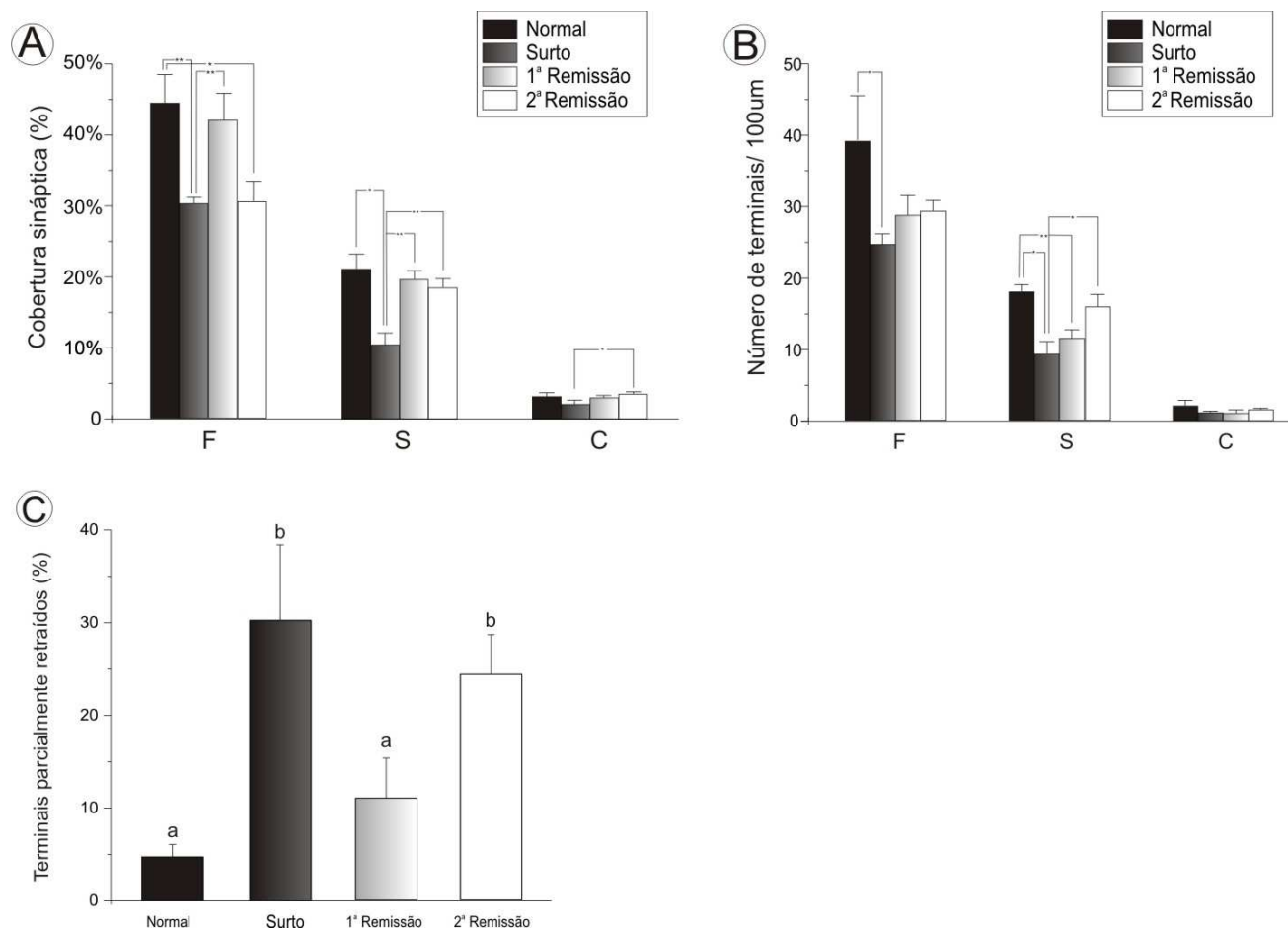


Figura 10 Análise detalhada da cobertura sináptica e número de botões sinápticos durante o curso da doença EAE, mostrando que durante o pico da doença há uma redução significativa de terminais pré-sinápticos. A: gráfico mostrando a redução de terminais tanto excitatórios quanto inibitórios no pico da doença. Durante a 1ª remissão, ambos terminais F e S recuperam a aposição. Entretanto, a perda de terminais inibitórios ocorre após a 2ª remissão criando um desbalanço das sinapses excitatórias/ inibitórias. Resultados similares são também observados pela análise dos números de botões sinápticos/ 100µm de membrana (B). C: gráfico representando o número parcial de terminais retraídos em diferentes estágios da doença. Observe que após a 2ª remissão, aproximadamente 25% dos terminais pré-sinápticos não recuperam as aposições. Isto indica uma falência no restabelecimento das conexões sinápticas após os subseqüentes surtos. Note que diferentes letras sobre cada barra indica diferença estatística.

4.5 Padrão da distribuição dos terminais após indução EAE.

A Figura 11 representa o padrão normal de distribuição dos espaços entre os botões sinápticos, ao longo da superfície dos motoneurônios, nos diferentes grupos. Em neurônios normais, os terminais mostram-se agrupados, havendo número relativamente menor de intervalos entre os inputs. Entretanto, durante o pico da doença, devido à retração sináptica observou-se aumento da frequência de intervalos entre terminais, bem como de suas dimensões, as quais atingiram até 14 μm .

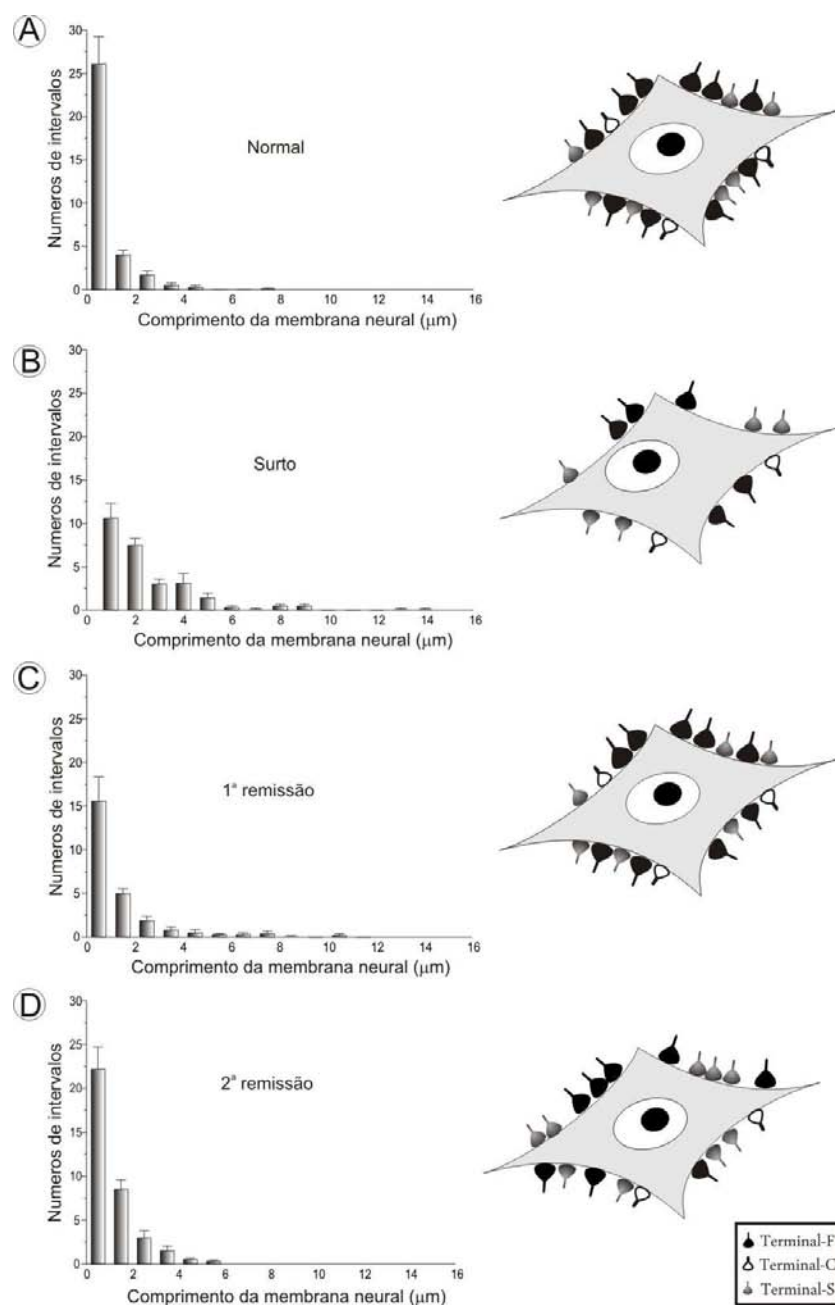


Figura 11. Distribuição dos espaços entre terminais na membrana dos motoneurônio afetados durante o curso da doença EAE. **A:** normal distribuição dos intervalos entre os terminais nervosos, mostrando que os terminais são organizados em grupos de inputs. **B:** a distribuição de terminais durante o pico da EAE foi alterada pela retração de terminais F e S. **C:** recuperação dos terminais retraídos, restauração dos intervalos ao longo da membrana dos motoneurônios após a 1ª remissão. Note aumento dos terminais inibitórios, provavelmente devido ao brotamento de terminais pré-sinápticos. **D:** recuperação de terminais retraídos com aumento de terminais excitatórios na 2ª remissão.

5. DISCUSSÃO

A molécula de MHC I e suas funções estão bastante caracterizadas no sistema imune, cuja função primária é apresentar antígenos para linfócitos T. Além disso, o MHC é bastante estudado, devido a variantes de seus *loci* estarem associadas com doenças autoimunes e inflamatórias (Fernando et al., 2008). Entretanto, estudos recentes mostram que a molécula de MHC I exerce importante função durante o desenvolvimento do tecido nervoso e após lesão (Huh et al., 2000; Oliveira et al., 2004). Neste sentido, a molécula de MHC pode participar tanto imunologicamente quanto exercer uma importante função no SN. No estudo atual mostramos que a expressão do MHC I também está presente durante o curso da EAE e pode ser interpretada como relacionada à ocorrência da plasticidade sináptica nas diferentes fases da doença. Em trabalho recente, mostramos que significativas mudanças ocorrem nas conexões medulares durante o surto da doença induzida em ratos Wistar (EAE na forma aguda e monofásica), podendo contribuir para o aparecimento dos sinais clínicos (Marques et al., 2006). Este fato também é reforçado nos resultados do presente estudo com relação à imunomarcagem anti-sinaptofisina e análise ultra-estrutural que mostram, durante o curso da doença, a perda de terminais sinápticos na superfície do motoneurônio espinhal. Tal fato foi observado no primeiro pico da doença, que resultou em extensiva retração dos inputs e, por sua vez, numa possível redução da atividade sináptica. Tal retração sináptica foi acompanhada por aumento da expressão de MHC I e reatividade das células gliais.

Na forma remitente/recorrente da EAE, o segundo pico da doença ocorre por volta de 1 a 2 semanas após o primeiro surto e, com relação ao sinal clínico, tende ser menos intenso. No presente trabalho, a flacidez da cauda foi observada em muitos casos e a completa paraplegia não esteve presente. Isto coincidiu com parcial recuperação da

expressão de sinaptofisina no núcleo motor. Além disso, a reação microglial marcada pelo anticorpo IBA1 não mostrou diferença significativa após o surto da doença, embora esteja aumentada em comparação à situação normal. Sabe-se que a microglia está relacionada, juntamente com os astrócitos, ao processo de retração sináptica. Porém, diante dos resultados obtidos, acreditamos que durante o curso da EAE crônica, os astrócitos tenham um papel relativamente mais ativo nesse processo, comparativamente à microglia.

Em relação aos astrócitos, a literatura relata tanto ação neuroprotetora quanto importante participação na eliminação de sinapses. Segundo Schonrock et al. (2000), o aumento do número de astrócitos expressando IL-6 na EM, promove a preservação dos oligodendrócitos e a diminuição da desmielinização. Além disso, a ativação dos receptores Toll-like 3 expressos pelos astrócitos podem mediar a produção de variedades de fatores neurotróficos, fatores angiogênicos, quimiocinas e citocinas anti-inflamatórias (Bsibsi et al., 2006). No presente estudo, o aumento da expressão de GFAP na 1ª remissão indica que os astrócitos são mais reativos neste estágio. Resultados similares descrevem que astrócitos no giro denteado promove o brotamento de neuritos ao expressar proteínas de células de adesão como S100 (Reeves et al., 1994). Este fato pode indicar que, durante o estágio de remissão da EAE, houve aumento da plasticidade sináptica que promoveu o restabelecimento das conexões locais. Logo, os astrócitos podem estar envolvidos num processo de brotamento de terminais pré-sinápticos durante o curso da doença.

A ocorrência do processo de brotamento axonal é também sugerido pelos resultados da análise ultra-estrutural obtidos nos diferentes estágios da doença. Assim, o número de terminais pré-sinápticos inibitórios aumentou após o primeiro pico da doença, embora o nível normal não tenha sido alcançado. Entretanto, o número de terminais excitatórios

aumentou para níveis normais, após a 2º remissão. Isto indica que a razão entre terminais inibitórios e excitatórios torna-se alterada durante o curso da doença. Assim, os terminais glutamatérgicos aumentaram em proporção. Lindå et al. (2000) descreveram que a incisão longitudinal do funículo ventral da medula, gerando a secção proximal dos axônios motores, leva a uma grande retração de terminais pré-sinápticos em aposição aos neurônios motores. Tal eliminação é preferencial para terminais glutamatérgicos, sendo provavelmente controlada pelo próprio motoneurônio como uma ação de remodelamento, já que o glutamato exerce efeito excitotóxico na célula nervosa.

Tendo-se em vista o acima descrito, acreditamos que ciclos de inflamação recorrentes durante o curso da EAE podem causar irreparável perda axonal, que pode mudar o balanço entre terminais excitatórios e inibitórios. Tal mudança pode ser o resultado da exaustão da capacidade de brotamento dos terminais pré-sinápticos, resultando na perda do potencial de remodelamento (Kerschensteiner et al., 2004). Esta condição pode contribuir para mudança no curso da doença, de remitente/ recorrente para a forma progressiva. Assim, corroborando esta hipótese, foi possível observar, após a 2º remissão da doença, que o número de terminais parcialmente retraídos aumentou. Além disso, nesta fase, a expressão de MHC I observada foi menor. De acordo com a prévia análise em diferentes linhagens isogênicas, demonstrou-se que animais C57BL/6J apresentavam menor expressão de MHC I comparativamente aos animais A/J, resultando em um reduzido potencial regenerativo (Sabha et al., 2008). Tal fato reforça a hipótese de exaustão da resposta à recorrentes surtos de doença.

Em resumo, os resultados do presente trabalho, indicam que a expressão de MHC I aumentou durante o curso da EAE, na sua forma remitente/ recorrente, correlacionando

com os períodos de plasticidade sináptica induzida pela infiltração de células imune auto-reativas. Nossa hipótese é que a diminuição da expressão de MHC I após a 2º remissão indica substancial diminuição do potencial regenerativo com relação aos inputs dos motoneurônios espinhais. Além disso, há evidências que a reatividade astrogliar, que é gradualmente aumentada em cada estágio da doença, possa contribuir para um positivo estímulo visando a recuperação nos circuitos medulares.

6. CONCLUSÕES

1. Há correlação entre perda da atividade sináptica e piora dos sinais clínicos da doença.
2. A astrogliose reativa pode contribuir como estímulo positivo na preservação dos circuitos neuronais.
3. A Expressão de MHC I está correlacionada à manutenção seletiva dos terminais sinápticos após a lesão.
4. A microglia parece não ser a principal responsável pelo processo de retração sináptica durante os estágios da doença na EAE.
5. Há uma intrínseca relação entre atividade glial e expressão de MHC I na preservação das aferências sinápticas dos motoneurônios alfa medulares.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aldskogius H, Svensson M. Neuronal and glial responses to axon injury. In S.K. Malhotra (eds): Adv. Struct. Biol. Greenwich, Connecticut: JAI Press. 1993
2. Aldskogius H, Svensson M. Glial Responses to Synaptic Damage and Plasticity. J Neurosci Res 1999;58:33-41.
3. Bannerman P, Hahn A, Soulika A, Gallo V, Pleasure D. Astrogliosis in EAE spinal cord: Derivation from radial glia, and relationship to oligodendroglia. Glia 2007;55:57-64.
4. Bernard CCA, Johns TG, Slavin A, Ichikawa M, Ewing C, Liu J, Bettadapura J. Myelin oligodendrocyte glycoprotein: a novel candidate autoantigen in multiple sclerosis. J Mol Med 1997;75:77-88.
5. Bsibsi M, Persoon-Deen C, Verwer RW, Meeuwssen S, Ravid R, Van Noort JM. Toll-like receptor 3 on adult human astrocytes triggers production of neuroprotective mediators. Glia 2006;53:688-695.
6. Boulanger LM, Hug GS, Shatz CJ. Neuronal plasticity and cellular immunity: shared molecular mechanisms. Curr Op Neurobiol 2001;11:568-578.

7. Bruck W. The pathology of multiple sclerosis is the result of focal inflammatory demyelination with axonal damage. *J Neurol* 2005;252:3-9.
8. Carvalho A, Sant'anna G, Santos CC, Frugulhetti IP, Leon AS, Santos TQ. Determinação de autoanticorpos para antígenos da mielina no soro de pacientes HLA-DQB1*0602 com Esclerose Múltipla. *Arq Neuropsiquiatr* 2003;61(4): 968-973.
9. Compston A, Coles A. Multiple Sclerosis. *The Lancet* 2002;359:1221-1231.
10. Conradi S. On motoneuron synaptology in adult cats. *Acta Physiol Scand* 1969;332: 1-57.
11. Correale J, Villa A. The neuroprotective role of inflammation in nervous system injuries. *J Neurol* 2004; 252(11):1304-1316.
12. Corriveau RA, Huh GS, Shatz CJ. Regulation of class I MHC gene expression in the developing and mature CNS by neural activity. *Neuron* 1998;21:505-520.
13. Cullheim S, Wallquist W, Hammarberg H, Lindå H, Piehl F, Carlstedt T, Risling M. Properties of motoneurons underlying their regenerative capacity after axon lesions

in the ventral funiculus or at the surface of the spinal cord *Brain Res Rev* 2002;40:309-316.

14. Cullheim S, Thams S. The microglial networks of brain and their role in neural network plasticity after lesion. *Brain Res Rev* 2007;55(1):89-96
15. De Stefano N, Matthews PM, Fu L, Narayanan S, Stanley J, Francis GS, Antel FP, Arnold DL. Axonal damage correlates with disability in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. Results of a longitudinal magnetic resonance spectroscopy study. *Brain* 1998;121:1469-1477.
16. Di Filippo M, Sarchielli P, Picconi B, Cavabresi P. Neuroinflammation and synaptic plasticity: theoretical basis for a novel immune centred, therapeutic approach to neurological disorders. *Trends Pharmacol Sci* 2008;29:402-412.
17. Emirandetti A, Zanon RG, Sabha JR, Oliveira ALR. Astrocyte reactivity influences the number of presynaptic terminals apposed to spinal motoneurons after axotomy. *Brain Res* 2006;1095:35-42
18. Farina C, Aloisi F, Meinl E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol* 2007;28(3):138-145

19. Fernando MM, Stevens CR, Walsh EC, De Jager PL, Goyette P, Plenge RM, Vyse TJ, Rioux JD. Defining the role of the MHC in autoimmunity: a review and pooled analysis. *Plos Genet* 2008;4(4):e10024.
20. Fridkis-Hareli M, Teitelbaum D, Gurevich E, Pecht I, Brautbar C, Kwon OJ, Brenner T, Arnon R, Sela M. Direct binding of myelin basic protein and synthetic copolymer 1 to class II major histocompatibility complex molecules on living antigen-presenting cells--specificity and promiscuity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 4872-4876.
21. Glezer I, Simard AR, Rivest S. Neuroprotective role of the innate immune system by microglia. *Neuroscience* 2007;147(4):867-883.
22. Goddard CA, Butts DA, Shatz CJ. Regulation of CNS synapses by neuronal MHC class I. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:6828-6833.
23. Hammarberg H, Lidman O, Lundberg C, Eltayeb SY, Gielen AW, Muhallab S, Svenningsson A, Linda H, Van Der Meide PH, Cullheim S, Olsson T, Piehl F. Neuroprotection by encephalomyelitis: rescue of mechanically injure neurons and neurotrophin production by CNS-infiltrating T and Natural Killer cells. *J Neurosci* 2000;20:5283-5291.

24. Hofstetter HH, Toyka KV, Gold R. Permanent effector phenotype of neuroantigen-specific T cells acquired in the central nervous system during experimental allergic encephalomyelitis. *Neurosci letters* 2006;391:127-30.
25. Hohlfeld R, Kerschensteiner M, Meinl E. Dual role of inflammation in CNS disease. *Neurology* 2007;68(22): 58-63.
26. Holoshitz J, Frenkel A, Frenkel A, Ben-Nun A, Cohen IR. Autoimmune encephalomyelitis (EAE) mediated or prevented by T lymphocyte lines directed against diverse antigenic determinants of myelin basic protein. Vaccination is determinantspecific. *J Immunol* 1983;131(6):2810-3.
27. Huh GS, Boulanger LM, Du H, Riquelme PA, Brotz TM, Shatz CJ. Functional requirement for class I MHC in CNS development and plasticity. *Science* 2000;290: 2155-58.
28. Jee Y, Liu R, Bai XF, Campagnolo DI, Shi FD, Vollmer TL. Do Th2 cells mediate the effects of glatiramer acetate in experimental autoimmune encephalomyelitis? *Int Immunol* 2006; 18(4):537-544.
29. Joy JE, Johnston RB. Multiple sclerosis current status and strategies for the future. Ed National Academy Press; 2003. p.29-46.

30. Jin S, Kawanokuchi J, Mizuno T, Wang J, Sonobe Y, Takeuchi H, Suzumura A. Interferon-beta is neuroprotective against the toxicity induced by activated microglia. *Brain Res* 2007; 1179:140-146.
31. Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM. *Principles of Neural Science*. Ed. McGraw-Hill; 2000.p.21-35. V.4.
32. Kerschensteiner M, Gallmeier E, Behrens L, Leal VV, Misgeld T, Klinkert WE, Kolbeck R, Hoppe E, Oropeza-Wekerle RL, Bartke I, Stadelmann C, Lassmann H, Wekerle H, Hohlfeld R. Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *J Med Exp* 1999;189(5):865-870.
33. Kerchensteiner M, Bareyre FM, Buddeberg BS, Merkler D, Stadelmann C, Bruck W, Misgeld T, Schwab ME. Remodeling of Axonal Connections Contributes to Recovery in an Animal Model of Multiple Sclerosis. *J Exp Med* 2004;200(8):1027-38.
34. Kerschensteiner M, Meinl E, Hohlfeld R. Neuro-immune crosstalk in CNS diseases. *Neuroscience*. 2008; Epub ahead of print

35. Kornek B, Storch MK, Weissert R, Wallstroem E, Stefferl A, Olsson T, Linington C, Schmidbauer M, Lassmann H. Multiple sclerosis and chronic autoimmune encephalomyelitis: a comparative quantitative study of axonal injury in active, inactive, and remyelinated lesions. *Am J Pathol* 2000;157:267-76.
36. Kreutzberg GW. Acute neuronal reaction to injury. In J.G. Nicholls (eds): Repair and regeneration of the nervous system. Berlin: Springer Verlag 1982
37. Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *TINS* 1996; 8(19):312-318.
38. Lampson LA. Interpreting MHC class I expression and class I/ class II reciprocity in the CNS: reconciling divergent findings. *Microsc Res Tech* 1995; 32: 267–285.
39. Liberto CM, Albrecht PJ, Herx LM, Yong VW, Levison SW. Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *J Neurochem* 2004; 89:1092-1100.
40. Lider O, Santos LM, Lee CS, Higgins PJ, Weiner HL. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral administration of myelin basic protein. II. Suppression of disease and in vitro immune responses is mediated by antigen-specific CD8+ T lymphocytes. *J. Immunol* 1989;142:748-752.

41. Lieberman AR. The axon reaction: a review of the principal features of perikaryal responses to axon injury. *Int. Rev. Neurobiol* 1971;14:49-124.
42. Lindå H, Shupliakov O, Örnung G, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Risling M, Cullheim S. Ultrastructural evidence for a preferential elimination of glutamate-immunoreactive synaptic terminals from spinal motoneurons after intramedullary axotomy. *J Comp Neurol* 2000;425:10-23.
43. Machado A. *Neuroanatomia Funcional*. Ed. Atheneu. 2002. p.9-42.V.2
44. Maier K, Kuhnert AV, Taheri N, Sättler MB, Storch MK, Williams SK, Bähr M, Diem R. Effects of glatiramer acetate and interferon-beta on neurodegeneration in a model of multiple sclerosis: a comparative study. *Am J Pathol* 2006; 169(4):1353-1364.
45. Marques KB, Santos LMB, Oliveira ALR. Spinal motoneuron synaptic plasticity during the course of an animal model of multiple sclerosis. *Eur. J Neurosci* 2006; 24(11):3053-62.
46. Maragakis N, Rothstein JD. Mechanisms of diseases: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat Clin Pract Neurol* 2006;12(2):679-89.

47. Moalem G, Leibowitz-Amit R, Yoles E, Mor F, Cohen IR, Schwartz M. Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. *Nature America* 1999;5:49-55.
48. Nair A, Frederick TJ, Miller SD. Astrocytes in multiple sclerosis: A product of their environment. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65(17):20702-20720.
49. Oliveira ALR, Thams S, Lidman O, Piehl F, Hökfelt T, Kärre K, Linda H, Culheim S. A role for MHC class I molecules in synaptic plasticity and regeneration of neurons after axotomy. *Proc Natl Acad Sci* 2004;101 (51), 17843–48.
50. Olsson T, Dahlman I, Wallstrom E, Weissert R, Piehl F. Genetics of rat neuroinflammation. *J Neuroimmunol* 2000;107:191-200.
51. Przedborski S, Vila M, Jackson- Lewis V. Neurodegeneration: what is it and where are we? *J Clin Invest* 2003;111(1):3-10.
52. Reeves RH, Yao J, Crowley MR, Buck S, Zhang X, Yarowsky P, Gearhart JD, Hilt DC. Astrocytosis and axonal proliferation in the hippocampus of S100b transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:5359-5363.
53. Rieckmann P, Smith KJ. Multiple sclerosis: more than inflammation and demyelination. *TINS* 2001;24(8):435-37.

54. Romanes G. Motor localisation and the effects of nerve injury on the ventral horn cells of the spinal cord. *J Anat* 1946;80: 117-31.
55. Sabha M Jr, Emirandetti A, Cullheim S, De Oliveira AL. MHC I expression and synaptic plasticity in different mice strains after axotomy. *Synapse* 2008;62(2):137-48.
56. Sanders P, De Keyser J. Janus faces of microglia in multiple sclerosis. *Brain Res Rev* 2007;54:274-285.
57. Serpe CJ, Kohm AP, Huppenbauer CB, Sanders VM, Jones KJ. Exacerbation of facial motoneuron loss after facial nerve transaction in severe combined immunodeficient (scid) mice. *J Neurosci* 1999;19:1-5.
58. Srinivasan B, Roque CH, Hempstead BL, Al-Ubaidi R, Roque RS. Microglia-derived pronerve growth factor promotes photoreceptor cell death via p75 neurotrophin receptor. *J Biol Chem* 2004;279 (40):41839-45.
59. Stromnes IM, Goverman JM. Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc* 2004; 1(4):1810-1819.

60. Thams S, Oliveira A, Cullheim S. MHC classI expression and synaptic plasticity after nerve lesion. *Brain Res Rev* 2008;57(1):265-9.
61. Thorsby E. MHC structure and function. *Transplant. Prec.* 1999;31:713-16.
62. Teixeira SA, Varriano AA, Bolonheis SM, Muscará MN. Experimental autoimmune encephalomyelitis: a heterogeneous group of animal models to study human multiple sclerosis. *Drug Discov Today* 2005; 2(2):127-133.
63. Thickbroom GW, Byrnes ML, Archer SA, Kermode AG, Mastaglia FL. Corticomotor organization and motor function in multiple sclerosis. *J Neurol* 2004;415 (5):1728-34.
64. Tilleux S, Hermans E. Neuroinflammation and Regulation of Glial Glutamate Uptake in Neurological Disorders. *J Neurosci Res* 2007;85:2059-70.
65. Zhu B, Luo L, Moore GR, Paty DW, Cynader MS. Dendritic and synaptic pathology in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol* 2003;162:1639-50.

ARTIGO SUBMETIDO

The Journal of Comparative Neurology

**MHC I expression and glial reaction influence spinal motoneuron synaptic plasticity
during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis**

Freria C.M.¹; Santos L.M.B.²; Oliveira A.L.R.¹

1. Laboratory of Nerve Regeneration, Dept. of Anatomy - Institute of Biology,
2. Dept. of Microbiology and Immunology – Institute of Biology, University of Campinas-
UNICAMP

Running title: MHC I and synaptic plasticity during the course of EAE

Name of Associate Editor to whom the manuscript is being submitted:

Professor John L.R. Rubenstein

University of California—San Francisco

Keywords: EAE, spinal cord, synapse elimination, motoneuron, glia, CNS plasticity.

Acknowledgements: This work was supported by FAPESP/Brazil (Grant numbers: 2006/05055-4 and 07/03645-1).

Abstract

Recent studies have shown that the expression of the major histocompatibility complex of class I (MHC I) directly influences the stability of nerve terminals. Also, the acute phase of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) has shown a significant impact on inputs within the spinal cord. Therefore, the present work investigated the synaptic covering of motoneurons during exacerbation and progressive remissions of EAE. EAE was induced in C57BL/6J mice, who were divided into 4 groups: normal, exacerbation (degree 3), first remission (30th day after EAE induction) and second remission (40th day). The animals were sacrificed and their lumbar spinal cords were processed for immunohistochemistry and transmission electron microscopy (TEM). The results indicated an increase in the glial reaction during the exacerbation phase. During this period, the TEM analysis showed a reduction in the synaptic covering of the motoneurons, corresponding to a reduction in synaptophysin immunolabeling and an increase in the MHC I expression. The results observed in both remission groups indicated a return to contact of the terminals with the motoneuron surface. However, a possible exhaustion of the regenerative potential occurred after the 2nd remission, since the number of synapses decreased significantly. Also, the ratio between excitatory/inhibitory inputs increased, indicating the development of an excitotoxic process. In conclusion, the results presented herein indicated that MHC I upregulation during the course of the remittent/recurrent form of EAE correlates with the periods of synaptic plasticity induced by the infiltration of auto-reactive immune cells, and that synaptic plasticity decreases after recurrent peaks of inflammation.

Introduction

Neuron-glia communication has an important role in regulating CNS responses during the development of and following lesion. Until recently, studies had shown that neurons did not express significant amounts of the major histocompatibility class I (MHC I) complex, so the CNS had been considered as “immunoprivileged”. Nonetheless, recent studies have indicated a function of the MHC I expression by neurons and glia regarding the selective maintenance of inhibitory synapses (Oliveira et al., 2004; Thams et al., 2008; Sabha et al., 2008). The absence of an MHC I expression results in an exacerbated synaptic detachment of the pre-synaptic terminals, decreasing the regenerative potential of the neurons (Oliveira et al., 2004). Thus the CNS and immune system possibly share part of the same molecular apparatus and are known to be engaged in an intense bidirectional crosstalk (Bauer et al., 2001; Di Filippo et al., 2008; Liu et al., 2006). In this way, glial cells are now viewed as crucial elements during the development of such events (Farina et al., 2007; Di Filippo et al., 2008).

The study of experimental autoimmune disease models is an important strategy for understanding the interaction between the immune and nervous systems. Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory autoimmune disease that has been marked by the demyelination process (Ferguson et al., 1997; Perry e Anthony, 1999; Kornek et al., 2000; Brück, 2005). Also, the inflammatory lesions are characterized by massive immune cell infiltration (Hammarberg et al., 2000; Brück, 2005; Liu et al., 2006). Thus the proliferation of microglial cells and astrogliosis may induce changes in the spinal cord network during episodes of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) (Marques et al., 2006). Interestingly, there is evidence that glial cells are involved in the synaptic detachment from

neuron somata and dendrites after lesion of the CNS, which is clear from the ultrastructural analysis of the spinal cord microenvironment in the EAE rat model (Marques et al., 2006). Nevertheless, the role of glial cells has also been considered as neuroprotective (Aldskogius e Svensson, 1999; Cullheim e Thams, 2007; Trapp et al., 2007). In agreement with this idea, Linda et al. (2000) suggested that the glutamatergic input removal could be interpreted as a strategy for avoiding the excitotoxicity mediated by glutamate.

As seen above, in EAE, an experimental animal MS model, significant plasticity is noted in the spinal cord environment in response to the demyelination process seen during the course of the disease (Marques et al., 2006). Also, according to Kerschensteiner et al. (2005), as a consequence of successive exacerbation episodes in EAE, accumulated damage of the CNS tissue can perturb and become impeditive for the reestablishment of neural connections.

Taking into account the above, reported alterations of the CNS environment in the EAE model, together with the new role of the MHC I complex in synaptic plasticity, the present work proposed to investigate the EAE-induced changes in the MHC I expression, synaptic covering and glial reaction in the area around alpha spinal alpha motoneurons, during exacerbation and the progressive remissions of the disease.

Material and methods

Animals

Forty adult female C57BL/6J mice (7 weeks old, 25g body weight) were obtained from the Multidisciplinary Center for Biological Investigation (CEMIB / UNICAMP) and housed using a 12 hour light / dark cycle with free access to food and water. The study was approved by the Institutional Committee for Ethics in Animal Experimentation (CEEAA / IB / UNICAMP, proc. 991-1) and the experiments were performed in accordance with the guidelines of the Brazilian College for Animal Experimentation. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) was induced in the mice, who were divided into four groups: normal, exacerbation (degree 3), first remission (30th day after EAE induction) and second remission (40th day after EAE). The animals were sacrificed and their lumbar spinal cords dissected out and processed for immunohistochemistry and transmission electron microscopy.

Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis

All reagents were obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) except those specifically mentioned. The disease was induced in the mice with an emulsion containing 60ug/animal MOG₃₅₋₅₅ peptide and complete Freund's adjuvant emulsion (CFA) supplemented with 2 mg/ml *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). This solution was injected subcutaneously into the brachial plexus of the animals. Pertussis toxin, 300 ng/animal was injected on the day of immunization and again 48 h later. The animals were monitored daily and neurological impairment classified

as follows: grade 0 - no clinical signs, grade 1- tail weakness or paralysis, grade 2 - hind limb paraparesis, grade 3 - hind limb paralysis, grade 4 - complete paralysis (tetraplegy).

Specimen preparation

Following the pre-determined survival periods, the animals were anesthetized with a mixture of Kensol (xylasin, 10 mg / kg, Köning) and Vetaset (ketamin, 50 mg / kg, Fort Dodge) and the vascular system rinsed by transcardial perfusion with phosphate buffer (pH 7.4). For the immunohistochemical detection of synaptophysin, glial fibrillary acidic protein (GFAP), IBA1 and MHC class I, the animals were fixed by vascular perfusion with 10% paraformaldehyde in phosphate buffer (pH 7.4). The lumbar intumescence was dissected out, post-fixed overnight, washed in phosphate buffer and stored in sucrose (20%) for 8 h before freezing. Cryostat transverse sections (12 μ m thick) of the spinal cords were obtained and transferred to gelatin-coated slides, dried at room temperature for 30 min and stored at -21°C until used. For electron microscopy, 100 mL of a fixative containing 2.5% glutaraldehyde and 0.5% paraformaldehyde in phosphate buffer (pH 7.4) was perfused through the ascending aorta. The lumbar spinal cords were removed and stored overnight in the same fixative at 4°C. The specimens were then trimmed and osmicated, dehydrated and embedded in Durcupan (Fluka, Steinheim, Switzerland). Ultra-thin sections from the L4–L6 segments were collected on formvar-coated copper grids, contrasted with uranyl acetate and lead citrate, and examined under a Leo 906 transmission electron microscope operating at 60 kV.

Immunohistochemistry

The lumbar spinal cords were frozen in liquid nitrogen at -40°C for cryostat sectioning (12µm). The sections were washed three times in PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4) and blocked with 3% bovine serum albumin (BSA) in Tris-buffered saline plus 0.2% Tween (TBS-T) for 1h. Primary rabbit anti-synaptophysin (1:100, Dako), goat anti- GFAP (1:100, Santa Cruz), rabbit anti-IBA (1:500, Wako) and rat-MHC class I (1:100, ABCAM) were diluted in a solution containing 1% BSA in TBS-T. The sections were incubated overnight at 4°C in a moist chamber. After rising in TBS-T, the sections were incubated with a Cy3 or Cy2- conjugated secondary antiserum (1:200, Jackson Immunoresearch) for 1 h in a moist chamber at room temperature. The sections were then rinsed in TBS-T, mounted in a mixture of glycerol/PBS (3:1), and observed with a Nikon eclipse TS100 inverted microscope (Nikon, Japan). For quantitative measurements, 3 representative images of the spinal cord were captured at a final magnification of ×20. Quantification was performed with the enhance contrast and density slicing feature of the IMAGEJ software (version 1.33u, National Institute of Health, USA). The integrated pixel density was systematically measured in six representative areas of the motor nucleus from each section, according to Oliveira et al. (2004). The integrated pixel density was calculated for each section and then as a mean value for each spinal cord. The data is represented as the mean ± standard error (SE).

Analysis of the ultra-thin sections

Neurons with large cell bodies (> 35 µm in diameter), found in the sciatic motoneuron pool and cut in the nuclear plane, were identified as alpha motoneurons by the presence of

C-type nerve terminals. The surface of the cells was then sequentially digitalized at a magnification of x10,000 using a video camera connected to a computerized system, plus the acquisition feature of the Kontron KS300 software (Zeiss, Germany). The images were then mounted together using vectorial software and the total perimeter of the neurons (in μm) measured. Synaptic terminals apposing the motoneuron somata were identified, and their numbers per 100 μm of cell membrane and the length of apposition in percent of membrane length calculated using the measurement tool of the image tool software (version 3.0, The University of Texas Health Center in Santo Antonio, TX, USA). The terminals were typed under high magnification (at least x25,000) as F (with flattened synaptic vesicles – inhibitory inputs), S (with spherical synaptic vesicles – excitatory inputs) or C (cholinergic inputs), according to the nomenclature of Conradi (1969). The relatively infrequent glutamatergic M-boutons, containing spherical synaptic vesicles and originating from Ia primary afferent fibers, were typed as S-boutons. It is important to emphasize that, even during the exacerbation of the disease, when the terminals displayed morphological alterations, the shape of the vesicles could still be identified. The distance between consecutive nerve terminals covering the motoneurons was also determined. A total of 40 motoneurons (two neurons per animal) in four groups of five animals ($n = 10$ neurons per group: control/normal, degree 3 of EAE, 1st remission and 2^{sd} remission) were studied in this way.

Statistical analysis

The data were analyzed by ANOVA and the two-tailed Student's t-test at $p < 0.05$ (*) and $p < 0.01$ (**).

Results

Increased MHC I expression in EAE-induced rats

The MHC I expression was accessed by quantitative measurements of the immunoreactivity in the spinal cord motor nuclei. Fig. 1 A-D show the MHC I complex expression, which was elevated during the exacerbation of the disease in comparison to the control. This increase was maintained during the 1st remission, but interestingly, presented a decrease during the 2nd remission (exacerbation - 12.32 ± 1.11 , 1st remission - 11.64 ± 1.22 , 2nd remission - 6.47 ± 1.59 ; $n=5$ for all groups; $\text{mean} \pm \text{SE}$; Fig. 1E).

Loss of synaptophysin immunoreactivity and increase in glial reaction in the EAE-induced animals

In order to access the changes in synaptic activity during the course of EAE, quantitative analyses for the immunoreactivity of the synaptic protein synaptophysin were performed in the spinal cord motor nuclei of the control animals as well as in the EAE-induced mice at the grade 3 and remission stages (1st remission and 2nd remission). The immunolabeling results are presented in Fig. 2 A-D and the quantitative analysis revealed a statistically significant decrease in the labeling at exacerbation/grade 3, corresponding to the period of paraplegia (normal - 16.92 ± 0.28 $\text{mean} \pm \text{SE}$, exacerbation - 7.54 ± 0.48 , 1st remission - 14.66 ± 0.51 , 2nd remission - 12.50 ± 1.00 , $n=5$ for all groups; Fig. 2E). During the 1st remission phase, immunolabelling recovered to a level similar to that of the normal group, corresponding to the improvement in the clinical signs of the disease. However, the 2nd remission phase showed a significant loss of inputs.

Immunoreactivity against glial fibrillary acidic protein (GFAP) and IBA1 was used in order to access the degree of glial reactivity during the course of the disease. In this sense, a statistically significant increase in both astrocyte (Fig. 3 – normal - 6.68 ± 0.85 mean $\pm$ SE, exacerbation/grade 3 - 9.87 ± 0.61 , 1st remission - 12.68 ± 1.35 , 2nd remission - 10.04 ± 1.15 , n=5 for all groups) and microglial (Fig. 4 – normal - 1.86 ± 0.28 mean $\pm$ SE, exacerbation/grade 3 - 5.40 ± 0.57 , 1st remission - 4.20 ± 0.44 , 2nd remission - 5.54 ± 0.45 , n=5 for all groups) reactivity was observed, especially in the motoneuron pool area.

During the 2nd remission, a decrease in astrocyte reactivity was observed. Nevertheless, the microglial reactivity maintained high throughout the course of the disease.

Figure 5 represents the correlation between the immunolabeling and the clinical scores obtained during the course of the disease. In this sense, during the exacerbation phase, which occurred around the 15th day after immunization, the maximum degree of synaptic loss correlated with a peak in the MHC I expression as well as with an increased astroglial reaction. Nevertheless, during the first remission, the decrease in the clinical signs was paralleled by a further upregulation of the GFAP, indicating the peak in the astroglial response to the disease. During the second remission, the synaptophysin labeling showed a significant decrease as compared to the first remission, which correlates with the worsening in the clinical score as well as with a decrease in the MHC I expression.

Ultrastructural analysis of the increased synaptic elimination during the exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis

A series of synaptic changes were identified at the ultrastructural level during the course of the disease. A total of 40 alpha motoneurons (n=10 neurons per group, two per animal in four groups of five animals, namely normal, degree 3 of EAE, 1st remission and 2nd remission) were analyzed in detail with respect to their synaptic covering, as well as the number and type of the synapses (F-terminals, representing inhibitory inputs; S-terminals, representing excitatory inputs and C-terminals, representing cholinergic inputs) in apposition to the cell body. Figure 6 shows the process of the synaptic retraction that occurs during the course of the disease.

A statistically significant reduction in F-terminals (normal group- $44.40 \pm 0.04\%$, exacerbation - 30.23 ± 0.01 , Fig. 7A) occurred during the peak of the disease, resulting in a ~47% decrease in the overall synaptic covering. This loss of inputs was partially recovered during the 1st remission stage, resulting in a ~39% increase in the overall synaptic covering. However, the improvement during the 2nd remission was not as good as that during the 1st remission (1st remission group, $41.99 \pm 0.36\%$; 2nd remission, $30.51 \pm 0.03\%$; Fig. 7A). Figure 7B shows that the number of F- and S-terminals decreased during the exacerbation of the disease. This loss was partially recovered in the following stages of the disease, although the normal covering was not achieved. Moreover, during the 2nd remission a sprouting of excitatory inputs took place, indicating an unbalance between the inhibitory/excitatory synapses.

With respect to this, an important observation is that the course of the disease induced a partial retraction of the terminals. This is shown in Fig. 7C and indicates that after the 2nd remission; the recovery of inputs was problematic, indicating a deterioration of the spinal cord network (normal – $4.74\% \pm 1.34$ mean $\pm$ SE, exacerbation/grade 3 - $30.26\% \pm 8.14$, 1st remission - $11.00\% \pm 4.33$, 2nd remission - 24.33 ± 4.28 , n=5 for all groups).

Pattern of the terminal distribution after induction of EAE

Figure 8 represents the normal pattern for the terminal distribution along the motoneuron surface in the different groups. In normal neurons the spacing of the terminals was restricted to a shorter soma membrane length, from 1 to 3 μ m. Such a distribution resulted in many bouton clusters. However, during the peak of the disease, the size of the interval increased up to 14 μ m. Thus, the disease induced an increased retraction of the terminals, resulting in a decrease in the frequency of short gaps. This fact indicates the elimination of groups of inputs during the course of EAE.

Discussion

The MHC I expression by neurons and glia has recently been described as a mechanism of communication that is operating during the development and aftermath of adult lesions (Corriveau et al., 1998; Huh et al., 2000; Goddard et al., 2007). In the neonate it is responsible, in part, for the refinement of synapses in the lateral geniculate nucleus during the postnatal maturation of the visual pathway. In this sense, the absence of the MHC I expression results in an incomplete segregation of inputs from the left and right eyes, causing the maintenance of aberrant connections that should have been eliminated (Huh et al., 2000).

In the adult, after a peripheral lesion, MHC I is also important in the acute phase following axotomy, since mutant mice that do not express such a functional molecule, are not capable of selectively retracting inputs. Such mutation results in an exacerbated motoneuron disconnection from the spinal cord network, and, in turn, a significant loss of regenerative potential (Oliveira et al., 2004).

The present study showed that the MHC I expression was also present during the course of EAE and may be related to the synaptic plasticity phenomena that occurs in the different phases of the disease. In this respect, the present authors recently suggested that the major changes occurring in the spinal cord network during the exacerbation of the disease may contribute to the appearance of the respective clinical signs. This fact is reinforced herein, based on synaptophysin immunolabeling as well as on the TEM analysis, which depicted a loss of inputs to the motoneurons in the spinal cord during the course of the disease. It is important to emphasize that the first peak of the disease results in

extensive retraction of inputs, indicating a reduction in synaptic activity. Such a fact is paralleled by an increase in MHC I labeling and glial markers.

In the remittent/recurrent form of EAE, the second peak of the disease occurs about one to two weeks following the first exacerbation and tends to be less intense with respect to the clinical score. In the present work, weakness of the hind limb was observed in most cases, but complete paraplegia was not present. This was paralleled by a partial recovery of synaptophysin labeling in the motor nucleus. Interestingly, the microglial reaction as monitored by immunolabeling against IBA1, did not change after exacerbation of the disease, although substantially increased in comparison to the normal situation. Although reactive microglia has been implicated, together with astrocytes, in the synaptic retraction process, this may indicate that microglia is not substantially involved in the rewiring process during the course of EAE.

Nevertheless, in the first remission phase, the GFAP expression increased to its highest levels, indicating that the astrocytes were more reactive at this stage. Similar results have been described for the dentate gyrus, where reactive astrocytes were found to express cell adhesion proteins as well as S100, which promote neurite extension (Reeves et al., 1994). This fact may indicate that in the situation of an EAE relapse, increased synaptic plasticity would be beneficial in order to restore a certain degree of local connectivity. For this to occur, pre-synaptic terminal sprouting might be necessary.

In fact, Kerschensteiner et al. (2004) have described extensive local growth response induced by traumatic lesions, and also during the inflammation associated with EAE. Strikingly, axonal sprouting was more prominent during the exacerbation of the disease, and neuronal outgrowth was enhanced close to the infiltrating immune cells. It has

been hypothesized that such cells are a source of growth promoting factors such as neurotrophins. Under these circumstances, the MHC I expression may also be involved, being associated with the selectivity of the process, as proposed in previous works (Huh et al., 2000; Oliveira et al. 2004).

The occurrence of an organized sprouting process is also supported by the ultrastructural results obtained at different stages of the disease. Interestingly, the number of inhibitory pre-synaptic terminals increased after the first peak of the disease, although normal levels were not achieved. On the other hand, the number of excitatory inputs increased up to normal levels after the second remission. This fact indicates that the ratio between inhibitory and excitatory inputs is altered throughout the course of EAE, so that glutamatergic terminals are augmented in proportion.

The preferential elimination of glutamatergic inputs after lesion to the spinal cord has been described previously (Lindå et al., 2000). Thus a longitudinal incision in the ventral funiculus of the spinal cord, cutting the motor axons very proximally, led to an extensive retraction of the pre-synaptic terminals in apposition to the axotomized motoneurons. Such an input elimination was controlled by the motoneuron itself, so that terminals using glutamate as their neurotransmitter were disconnected to a larger extent than nerve terminals with inhibitory amino acids. This indicates that lesioned neurons avoid a process of excitotoxicity that could ultimately result in cell loss.

However, recurrent cycles of EAE may cause irreparable axonal damage, which, in turn, changes the balance between excitatory and inhibitory inputs. Such changes may be the result of an exhaustion of the sprouting capacity of the terminals and ultimately, of the remodeling potential (Kerschensteiner et al., 2004). These conditions may contribute to a

change in the course of the disease, from the remittent/recurrent to the progressive form. Also, the observation that the number of partially detached terminals increases during the second remission is in line with this hypothesis.

Additionally, the MHC I expression reached their lowest levels after the second remission of the disease. According to the previous analyses performed in different isogenic mice strains, such a level of MHC I indicates a lower regenerative potential (Sabha et al., 2008) and may reinforce the hypothesis of exhaustion of the response to recurrent relapses of the disease.

In summary, the results presented herein indicated that MHC I upregulation during the course of the remittent/recurrent form of EAE correlated with the periods of synaptic plasticity induced by the infiltration of auto-reactive immune cells. Thus the present authors hypothesized that MHC downregulation after the second remission phase indicated a substantial decrease in regenerative potential of the inputs to the spinal motoneurons. It also indicated that the astroglial reaction, which gradually increased at each stage of the disease, may contribute as a positive stimulus to the rewiring of the spinal cord circuits.

References

1. Aldskogius H, Svensson M. 1999. Glial Responses to Synaptic Damage and Plasticity. *J Neurosci Res* 58:33-41.
2. Bauer J, Rauschka H, Lassmann H. 2001. Inflammation in the nervous system: the human perspective. *Glia* 36:235-243.
3. Bruck W. 2005. The pathology of multiple sclerosis is the result of focal inflammatory demyelination with axonal damage. *J Neurol* 252:3-9.
4. Conradi S. 1969. On motoneuron synaptology in adult cats. *Acta Physiol Scand Suppl* 332:5-48.
5. Corriveau RA, Huh GS, Shatz CJ. 1998. Regulation of class I MHC gene expression in the developing and mature CNS by neural activity. *Neuron* 21:505-520.
6. Cullheim S, Thams S. 2007. The microglial networks of brain and their role in neural network plasticity after lesion. *Brain Res Rev* 55:89-96.
7. Di Filippo M, Sarchielli P, Picconi B, Cavabresi P. 2008. Neuroinflammation and synaptic plasticity: theoretical basis for a novel immune centred, therapeutic approach to neurological disorders. *Trends Pharmacol Sci* 29:402-412.

8. Farina C, Aloisi F, Meinl E. 2007. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol* 28:138-145.
9. Ferguson B, Matyszak MK, Esiri MM, Perry VH. 1997. Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 120:393-399.
10. Goddard CA, Butts DA, Shatz CJ. 2007. Regulation of CNS synapses by neuronal MHC class I. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:6828-6833.
11. Hammarberg H, Lidman O, Lundberg C, Eltayeb SY, Gielen AW, Muhallab S, Svenningsson A, Linda H, Van Der Meide PH, Cullheim S, Olsson T, Piehl F. 2000. Neuroprotection by encephalomyelitis: rescue of mechanically injured neurons and neurotrophin production by CNS-infiltrating T and Natural Killer cells. *J Neurosci* 20:5283-5291.
12. Huh GS, Boulanger LM, Du H, Riquelme PA, Brotz TM, Shatz CJ. 2000. Functional requirement for class I MHC in CNS development and plasticity. *Science* 290:2155-2158.
13. Kerchensteiner M, Bareyre FM, Buddeberg BS, Merkler D, Stadelmann C, Bruck W, Misgeld T, Schwab ME. 2004. Remodeling of Axonal Connections Contributes to Recovery in an Animal Model of Multiple Sclerosis. *J Exp Med* 200:1027-1038.

14. Kornek B, Storch MK, Weissert R, Wallstroem E, Stefferl A, Olsson T, Linington C, Schmidbauer M, Lassmann H. 2000. Multiple sclerosis and chronic autoimmune encephalomyelitis: a comparative quantitative study of axonal injury in active, inactive, and remyelinated lesions. *Am J Pathol* 157:267-276.
15. Lindå H, Shupliakov O, Örnung G, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Risling M, Cullheim S. 2000. Ultrastructural evidence for a preferential elimination of glutamate-immunoreactive synaptic terminals from spinal motoneurons after intramedullary axotomy. *J Comp Neurol* 425:10-23.
16. Liu Y, Teige I, Birnir B, Issazadeh-Navikas S. 2006. Neuron-mediated generation of regulatory T cells from encephalitogenic T cell suppresses EAE. *Nature* 5:518-524.
17. Marques KB, Santos LMB, Oliveira ALR. 2006. Spinal motoneuron synaptic plasticity during the course of an animal model of multiple sclerosis. *Eur J Neurosci* 24:3053-3062.
18. Oliveira AL, Thams S, Lidman O, Piehl F, Hökfelt T, Kärre K, Lindå H, Culheim S. 2004. A role for MHC class I molecules in synaptic plasticity and regeneration of neurons after axotomy. *Proc Natl Acad Sci* 101:17843–17848.

19. Perry VH, Anthony DC. 1999. Axon damage and repair in multiple sclerosis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354:1641-1647.
20. Reeves RH, Yao J, Crowley MR, Buck S, Zhang X, Yarowsky P, Gearhart JD, Hilt DC. 1994. Astrocytosis and axonal proliferation in the hippocampus of S100b transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91:5359-5363.
21. Sabha M, Emirandetti A, Cullheim S, Oliveira AL. 2008. MHC I expression and synaptic plasticity in different mice strains after axotomy. *Synapse* 62:137-148.
22. Thams S, Oliveira A, Cullheim S. 2008. MHC class I expression and synaptic plasticity after nerve lesion. *Brain Res Rev*. 57:265-269.
23. Trapp BD, Wujek JR, Cristie GA, Jalabi W, Yin X, Kidd GJ, Stohlman S, Ransohoff R. 2007. Evidence for synaptic stripping by cortical microglia. *Glia*. 55:360-368.

Figure 1

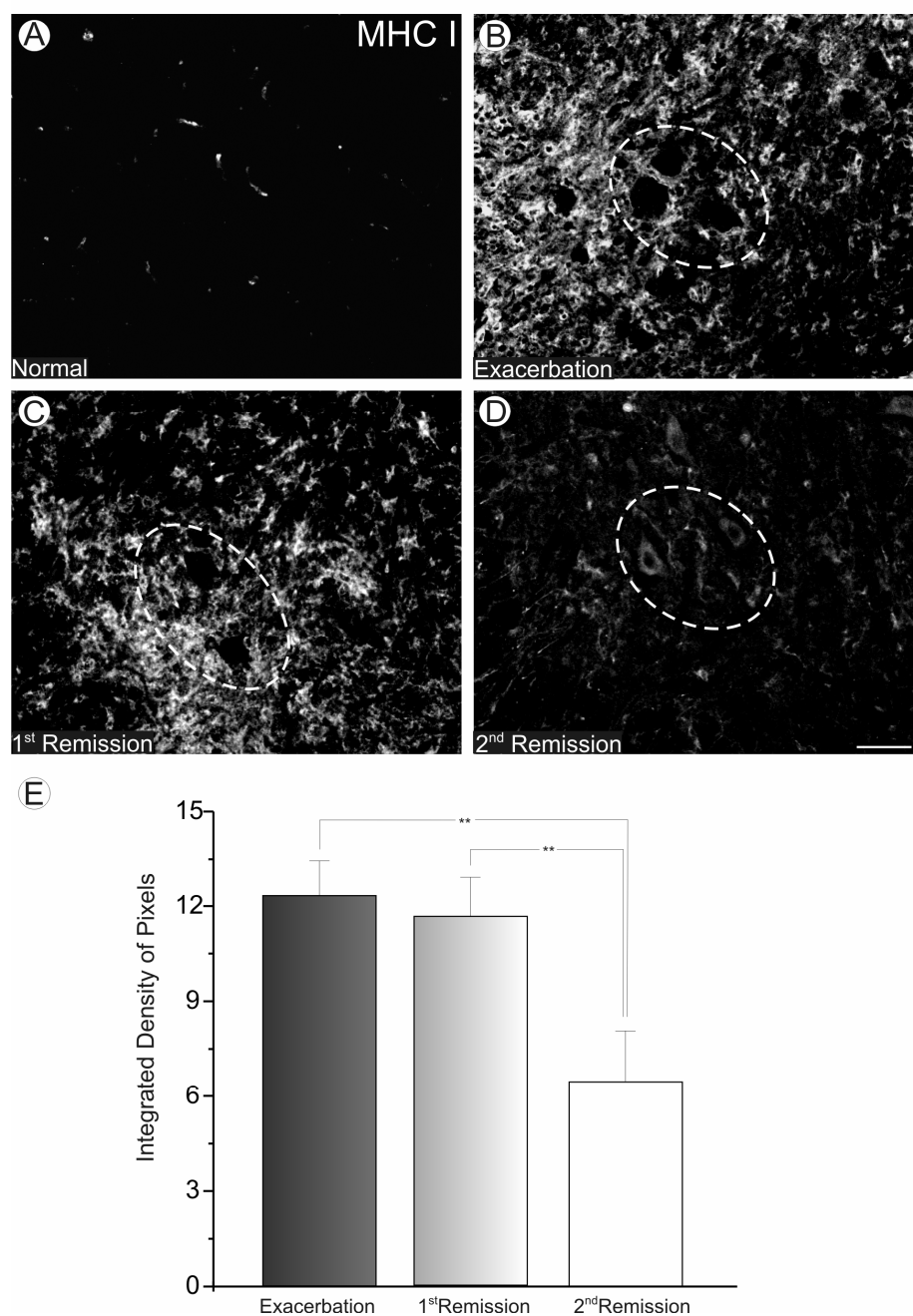


Fig 1. MHC class I immunolabeling in the spinal cord ventral horn of C57BL/6 mice: normal (A), exacerbation (degree 3) of EAE (B), 1st remission (C) and 2nd remission (D). Note the almost absent MHC I expression in the normal group, and the overall increase in labeling in all groups, especially in the exacerbation group. Quantification of the integrated density of pixels in each group is depicted in graph (E). Scale bar=20µm.

Figure 2

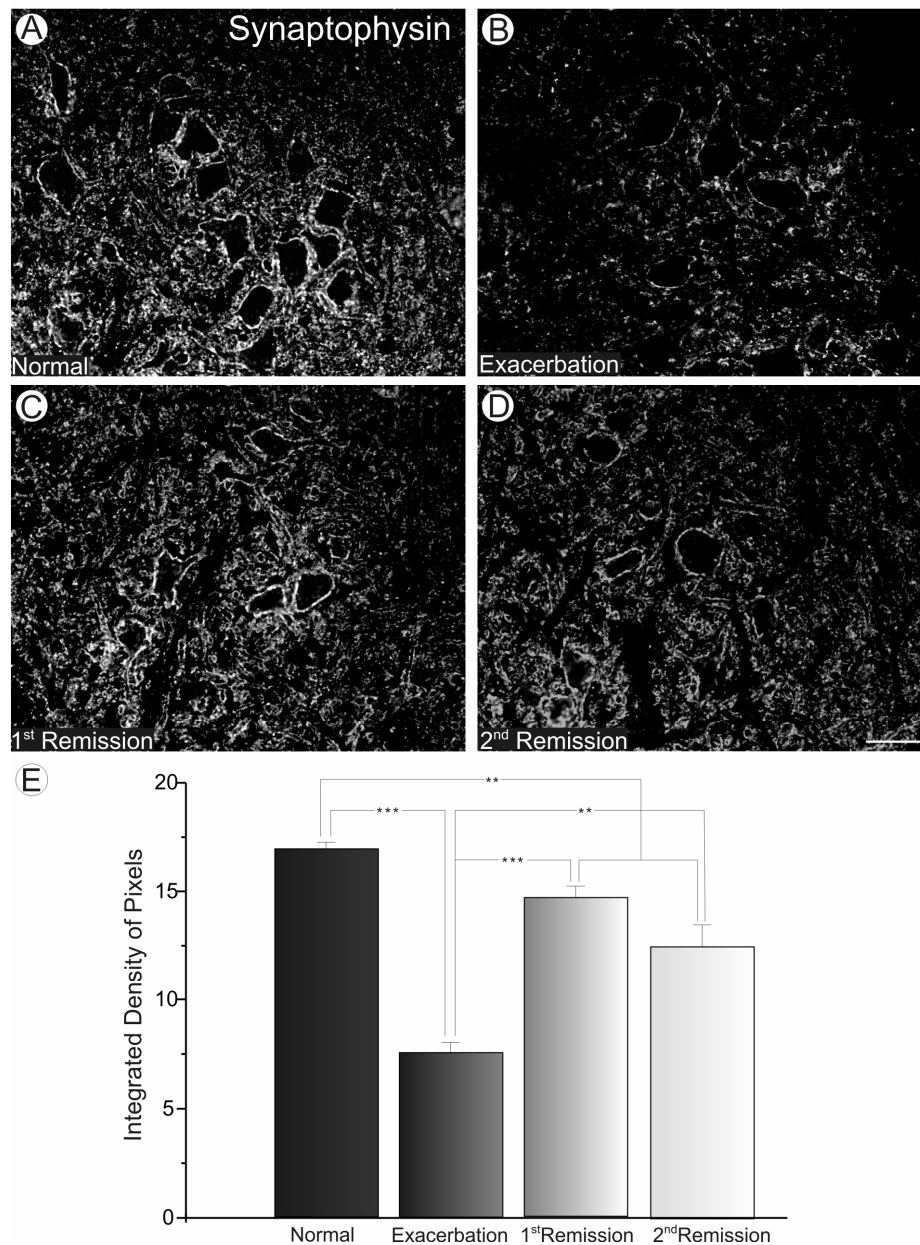


Fig. 2. Synaptophysin immunolabeling in the spinal cord of C57BL/6 mice: normal (A), exacerbation (degree 3) of EAE (B), 1st remission (C) and 2nd remission (D). Observe the decrease in labeling in the exacerbation group, indicating the decrease in synaptic covering on the surface of the neurons during the peak of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). Note that the synaptic covering partially recovered in the remission stages. The graph represents the quantification of the immunolabeling in all groups (E). Scale bar=20 μ m.

Figure 3

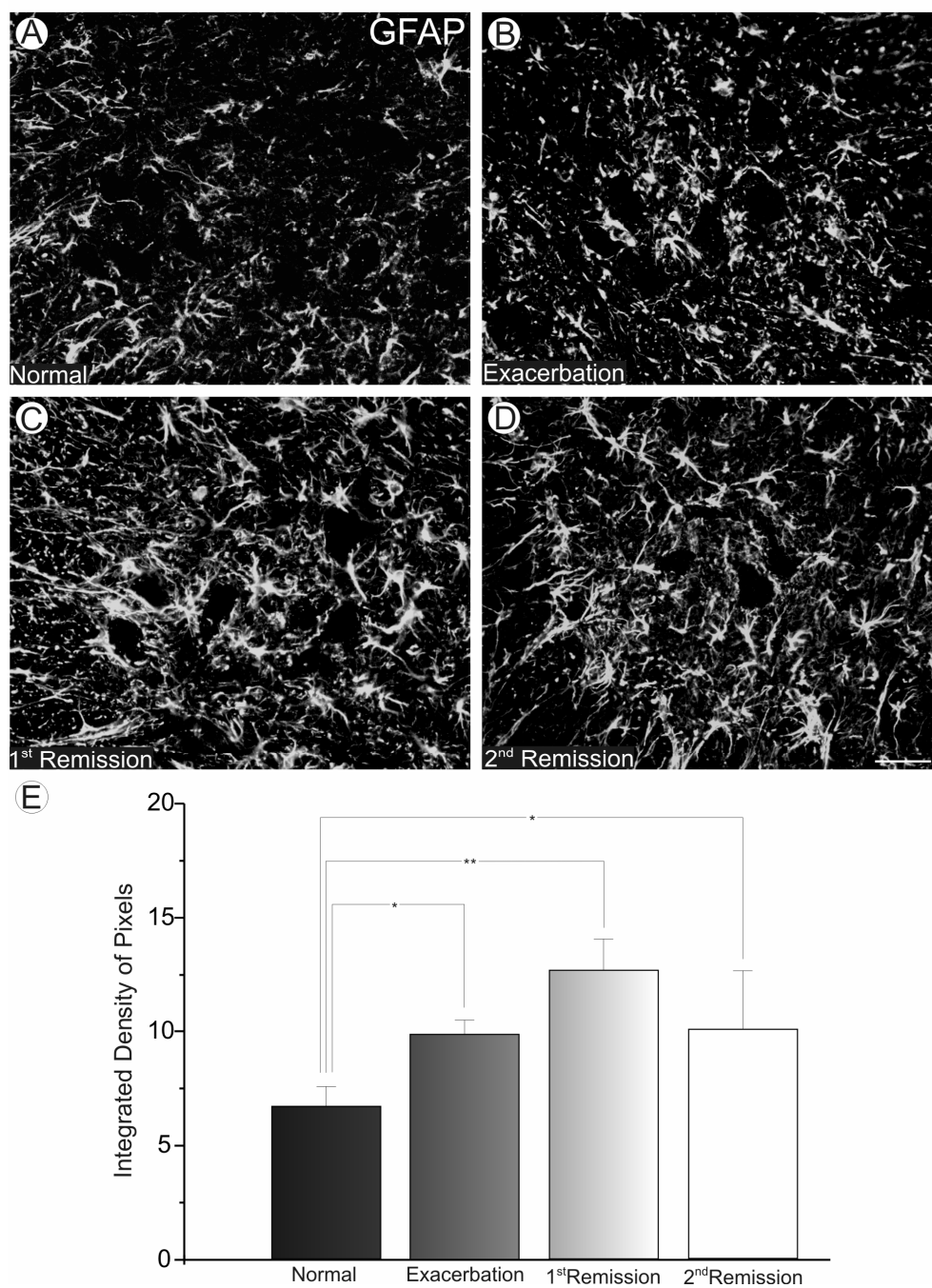


Fig. 3. Glial acidic protein (GFAP) immunolabeling in the spinal cord of C57BL/6 mice: normal (A), exacerbation (degree 3) of EAE (B), 1st remission (C) and 2nd remission (D). Observe the increase in labeling during the peak of the disease, indicating the possible role of reactive astroglia in the synaptic plasticity process. The graph represents the quantification of the immunolabeling in all groups (E). Scale bar=20 μ m.

Figure 4

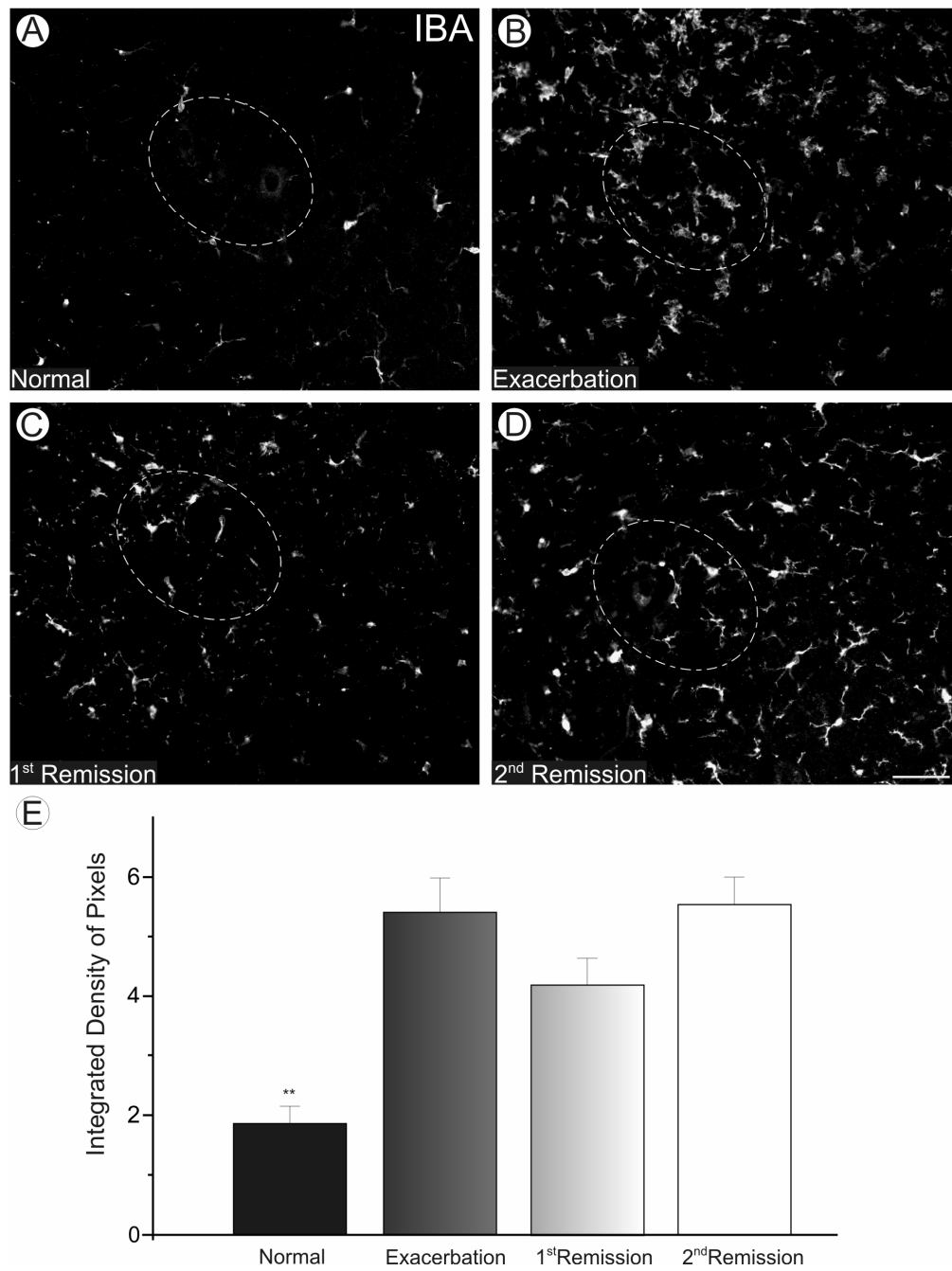


Fig. 4. IBA1 immunolabeling in the spinal cord of C57BL/6 mice: normal (A), exacerbation (degree 3) of EAE (B), 1st remission (C) and 2nd remission (D). Observe the increase in labeling during the peak of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), which was maintained during the remission stages. The graph represents the quantification of the immunolabeling in all groups (E). Scale bar=20 μ m.

Figure 5

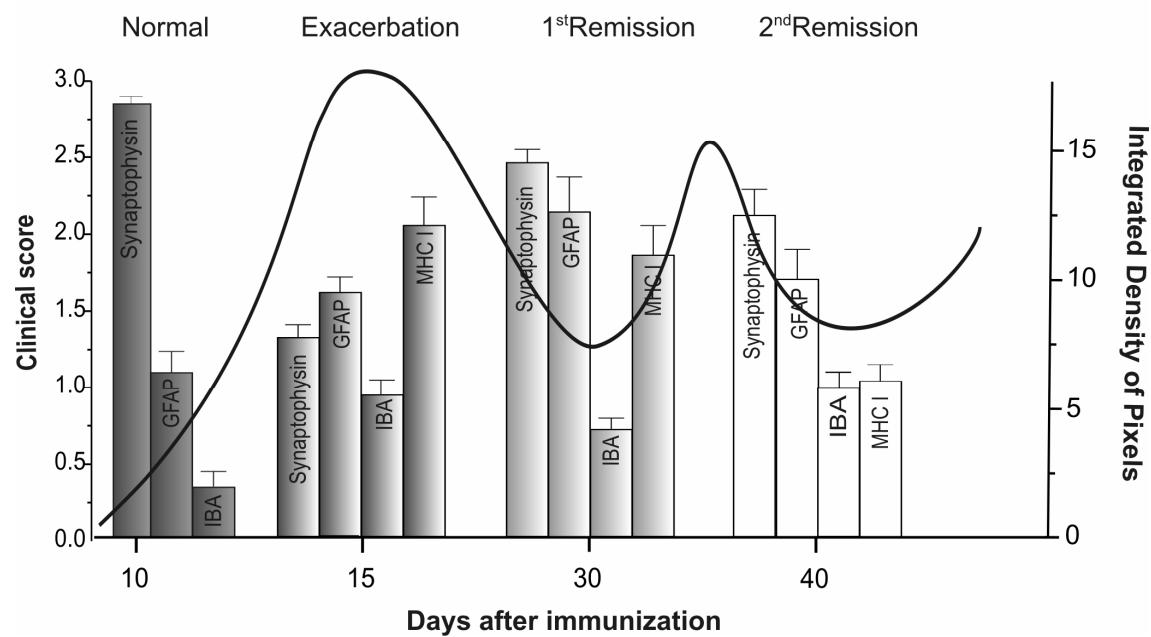


Fig. 5. Graphs representing correlation between the quantification of immunolabeling and the different stages of the disease. Note that the MHC I expression increased in the stages where synaptic plasticity was present. The decrease in MHC I immunolabeling during the 2nd remission possibly indicated a decreased potential to respond to injury.

Figure 6

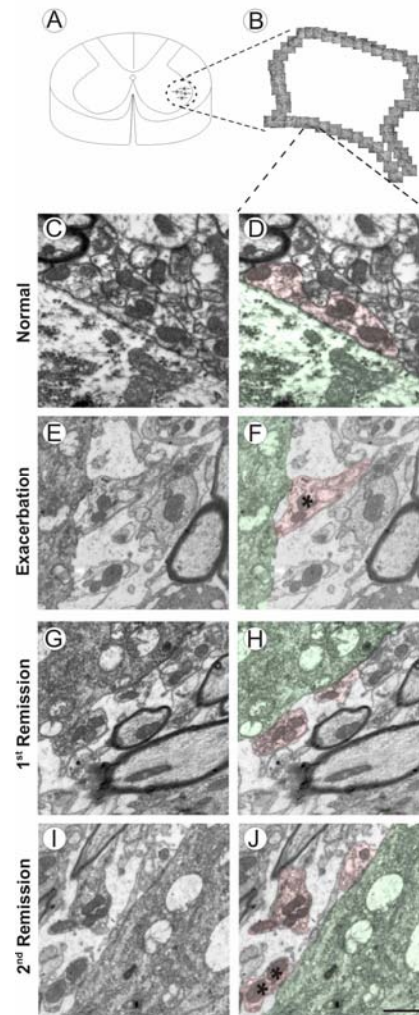


Fig. 6. **A:** Schematic drawing of a transverse section of the mice spinal cord at the lumbar level, showing the dorsolateral motoneuron pool that was used for the ultrastructural analysis. **B** represents the ultrastructural reconstruction of an alpha motoneuron. The entire cell surface was obtained at a magnification of 10,000 $\times$ by sequentially photographing the neuron. **C:** Normal inputs on the surface of an alpha motoneuron. **D:** terminals highlighted in salmon and motoneuron cytoplasm colorized in green. **E:** Example of a degree 3 (exacerbation) EAE-induced specimen. Note the retraction of the nerve terminal from the surface of the motoneuron. **F:** terminals highlighted in salmon and motoneuron cytoplasm colorized in green. * = pre-synaptic terminal. **G:** Representative example of the 1st remission, showing the reapposition of terminals. **H:** terminals highlighted in salmon and motoneuron cytoplasm colorized in green. **I:** Example of the 2nd remission phase, showing the partial recovery of apposition of the terminals. **J:** terminals highlighted in salmon and motoneuron cytoplasm colorized in green. **=partially detached terminal. Scale bar= 1 μ m.

Figure 7

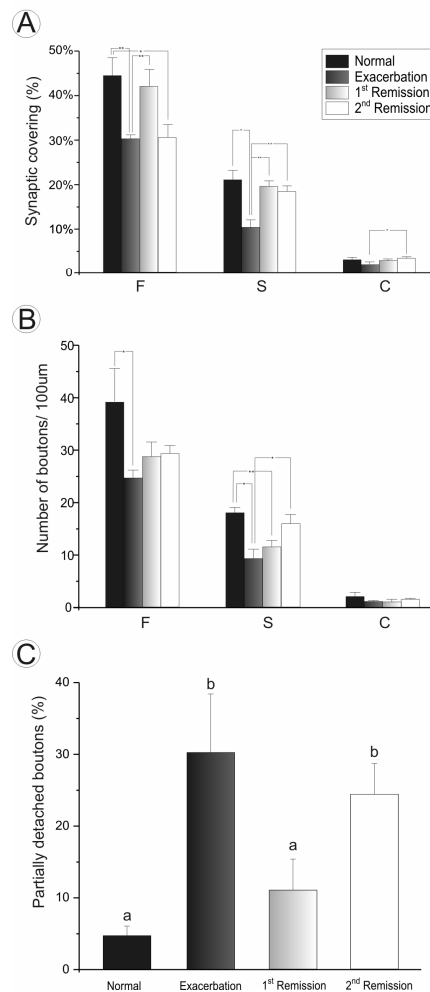


Fig. 7. Detailed analysis of the covering and number of synaptic boutons during the course of the Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) revealing that, during the peak of the disease, there was a significant reduction in pre-synaptic terminals. **A:** Graph showing the overall reduction in both excitatory and inhibitory inputs at the peak of the disease. During the 1st remission phase, both F and S-terminals recovered their apposition. However, a further loss of inhibitory inputs occurred after the 2nd remission, creating an imbalance in the excitatory/inhibitory synapses. Similar results were also observed in the analysis of the number of boutons/100 μm of membrane (**B**). **C:** Graph representing the number of partially retracted terminals in the different stages of the disease. Observe that after the 2nd remission; approximately 25% of all pre-synaptic terminals were not completely apposed to the motoneuron membrane. This indicated a failure in reestablishing the synaptic network after subsequent relapses of the disease. Note that different letters on each bar indicate statistical difference.

Figure 8

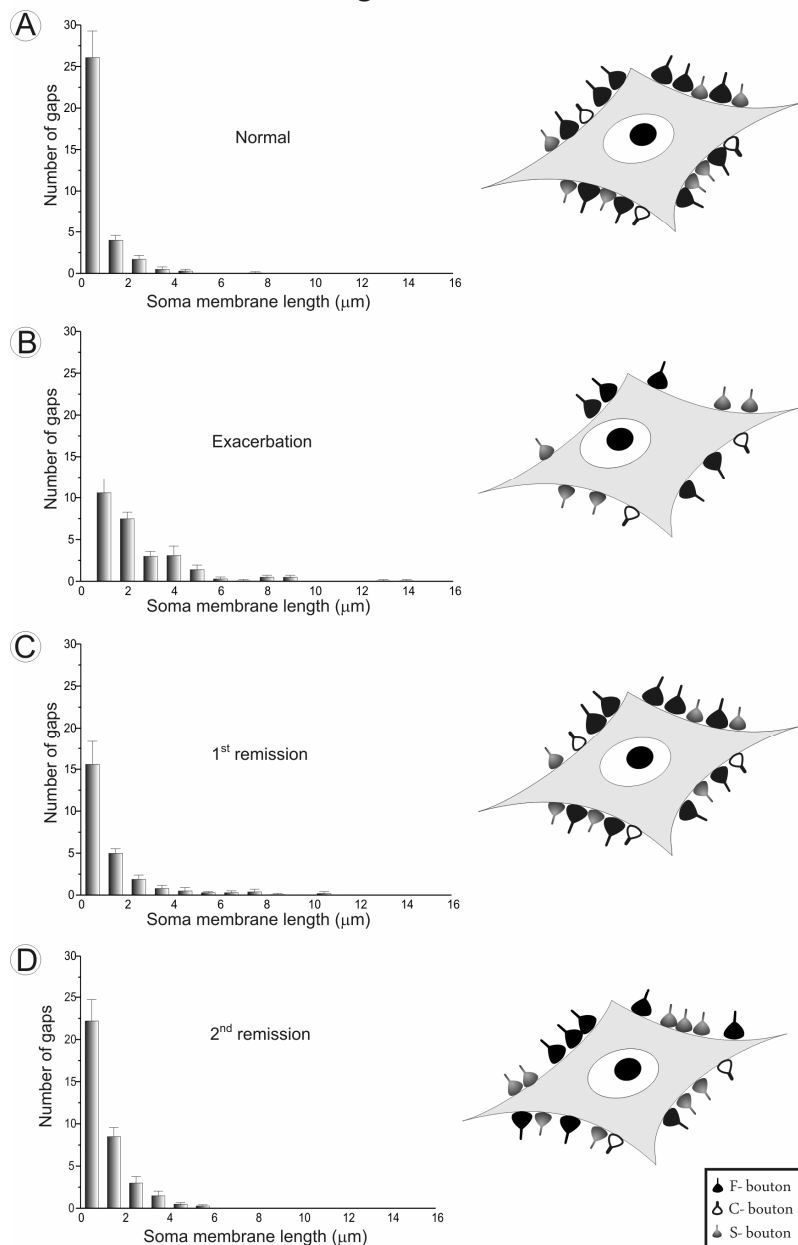


Fig. 8. The distribution of the gap length between clusters of terminals apposing the cell soma membrane was affected during the course of the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). **A:** Normal distribution of the intervals between the nerve terminals showing that the boutons were organized in clusters of inputs. **B:** The distribution of terminals during the EAE peak was altered by retraction of the F- and S-terminals. **C:** Recovery of retracted terminals, restoring the original distribution of clusters along the motoneuron membranes after the 1st remission. Note that the inhibitory clusters increased, probably due to pre-synaptic input sprouting. **D:** Recovery of the retracted terminals with an increase in the excitatory terminals in the 2nd remission.