

Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Ciências Médicas

Juliana Milani Scorisa

**Influência do acetato de glatirâmer (AG) sobre a
estabilidade sináptica e reação glial durante o curso da
EAE e após avulsão de raízes motoras**

Campinas 2009

Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Ciências Médicas

Juliana Milani Scorisa

**Influência do acetato de glatirâmer (AG) sobre a
estabilidade sináptica e reação glial durante o curso da
EAE e após avulsão de raízes motoras**

Tese 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

Campinas 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA

BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP

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

Sc71i Scorisa, Juliana Milani
Influência do acetato de glatirâmer (AG) sobre a estabilidade sináptica e reação glial durante o curso da EAE e após avulsão de raízes motoras / Juliana Milani Scorisa. Campinas, SP : [s.n.], 2009.

Orientador : Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Encefalomyelite auto – imune Experimental. 2. Esclerose múltipla. 3. Complexo principal de histocompatibilidade. I. Oliveira, Alexandre Leite Rodrigues de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Influence of Glatiramer acetate on the synaptic stability and glial reaction during the EAE and after motor root avulsion

Keywords: • Encephalomyelitis, autoimmune, experimental
• Multiple sclerosis
• Major Histocompatibility Complex

Titulação: Mestre em Clínica Médica

Área de concentração: Ciências Básicas

Banca examinadora:

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira

Profa. Dra. Marimélia Porcinatto

Profa. Dra. Maria Alice da Cruz Höfling

Data da defesa: 10-06-2009

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Juliana Milani Scorisa

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira

Membros:

1. Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira

2. Prof.^a. Dr.^a. Marimélia Porcionatto

3. Prof.^a Dr.^a. Maria Alice Da Cruz Höfling

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

Data: 10/06/2009

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”

Leonardo da Vinci

Dedicatória

Aos Meus pais, Rose e Roberto que sempre me ensinaram a lutar e não desistir dos meus sonhos, me apoiando sempre que necessário e me dedicando um amor incondicional.

Ao meu querido irmão Murilo, que desde a infância me deu mais motivos para sorrir e ser feliz. Obrigado pelo apoio e amor.

Ao meu noivo Leonardo, por apoiar e incentivar minha vida; sonhar meus sonhos e fazê-los tornarem realidade de uma forma muito especial.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira pela honra de tê-lo como meu orientador, pela enorme contribuição em minha formação científica e pela confiança depositada em mim.

Aos amigos do Laboratório de Regeneração Nervosa e plasticidade sináptica: Amauri, Aline, Camila, Gustavo, Gabriel, Luciana, Roberta, Rodrigo, Suzana e Sheila.

A Renata Zanon que me ajudou muito no desenvolvimento desse trabalho e pela amizade cultivada por esses anos.

A Amanda Emirandetti pela grande amizade que nasceu em tão pouco tempo de convívio e pela ajuda que sempre me deu.

A minha amiga Rafaela Chitarra Rodrigues Hell que engrandeceu meus conhecimentos científicos, ajudou em meus experimentos e acima de tudo pela enorme amizade.

Aos funcionários do Departamento de Anatomia: Ana, Marlene, Marcos e Nori pela atenção diária.

A querida professora Maria Silvia Mariani Pires de Campos que me proporcionou o início das pesquisas ainda na graduação. Muito obrigada por ter me mostrado a vida científica.

A minha querida amiga Juliana Rosalen que por tantos anos acompanha minha jornada. Obrigada pelo carinho.

Aos meus queridos: Gilberto, Marilza, Milton, Sandra, Miguel, Mariza e a minha avó Ivone que sempre torceram por mim todos esses anos.

A minha querida Tata que de forma singular participa de minha vida.

Aos animais de laboratório que deram suas vidas para que a ciência pudesse avançar. Sem eles não poderia ter realizado esse projeto, muito obrigada.

Meu agradecimento especial e particular a Deus por estar sempre ao meu lado iluminando meu caminho.

A CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro.

Resumo

A Esclerose múltipla (EM) é uma doença inflamatória, desmielinizante do sistema nervoso central (SNC). Sua etiologia é desconhecida, porém, sua progressão se deve a ocorrência de uma importante resposta auto-imune. O acetato de glatirâmer (AG) é um medicamento utilizado em pacientes com esclerose múltipla e é constituído por um copolímero de 4 peptídeos homólogos à proteína básica da mielina (MBP), capaz de diminuir a exacerbação e o número lesões da doença. Pouco se sabe sobre o impacto do tratamento com AG sobre o SNC, principalmente, se este medicamento influencia na estabilidade das sinapses medulares durante o curso da doença. Uma molécula importante para a manutenção do SNC é o complexo de histocompatibilidade principal de classe I (MHC I), que participa na regulação homeostática e função sináptica. Para este estudo, utilizamos o modelo animal da EM, a Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE) e a avulsão de raízes motoras da medula espinhal para investigar a plasticidade sináptica e reatividade glial sobre o efeito do AG no SNC. A doença (EAE) foi induzida em camundongos C57BL/06 que foram divididos em 4 grupos. Trinta animais foram submetidos à EAE e tratados com AG, sendo 15 tratados até o surto da doença e 15 tratados até a fase de remissão dos sinais clínicos. Para o grupo placebo, 30 animais foram tratados com solução salina e foram divididos também em 2 sub-grupos, com 15 animais tratados até o surto e 15 tratados até a remissão. Já a avulsão (AV) foi realizada em 20 ratos Lewis que foram divididos em 2 grupos com 10 animais cada, um grupo tratado com AG e um grupo tratado com placebo (salina) por 14 dias. Os resultados dos camundongos

submetidos a EAE foram analisados por imunistoquímica (n=5) e *Western blotting* (n=5). Uma análise qualitativa dos motoneurônios medulares e suas aferências também foi realizada através de microscopia eletrônica de transmissão (n=5). Os ratos avulsionados (n=20) foram divididos em grupos de 10 animais para o estudo imunistoquímico e 10 para avaliação neuronal. Os resultados mostram que o AG tem a capacidade de diminuir a expressão de MHC classe I nos camundongos com EAE e nos ratos submetidos AV; também influencia a manutenção de sinapses e regula parte do processo inflamatório desenvolvido pela doença ou pela lesão mecânica. Houve uma diminuição, em ambos os experimentos (EAE e avulsão), da expressão da proteína astrocitária, GFAP- *glial fibrillary acidic protein*, assim como uma diminuição da reatividade microglial observada por Iba-1. Através da imunomarcagem das sinapses na coluna anterior da medula espinhal, pode-se observar maior preservação desses inputs nos animais tratados. A avaliação da sobrevivência neuronal realizada nos ratos submetidos à AV também mostrou maior preservação de motoneurônios nos animais tratados. Portanto, o AG parece exercer um papel relevante no SNC diminuindo a expressão de MHC I e proporcionando melhor estabilidade sináptica e preservação neuronal, tanto em uma situação de lesão autoimune quanto após traumas mecânicos no SNC.

Abstract

Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory and demyelinating disease, which etiology is unknown. Although it is the result of a major autoimmune response. The Glatiramer acetate (GA) is a drug used to treat MS and is composed by four peptides homologous to the myelin basic protein (MBP), that is able to reduce the exacerbation and injuries to the CNS. Nevertheless it is possible that GA develops a direct effect on the CNS by modulating the expression of the major histocompatibility complex of class I (MHC I), which has recently been involved in the synaptic plasticity process. For this study an animal model for MS was used, namely the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as well as the spinal motor root avulsion (AV) was used to investigate the synaptic plasticity and glial react in the CNS after GA treatment. EAE was induced in C57BL/6 mice which were divided into 4 groups. Thirty animals were induced to EAE and treated with GA, 15 animals were treated until the placebo group reached the exacerbation of the disease and other 15 animals were treated until the remission phase. The placebo treated group, treated up to the followed same procedures of the GA treated groups. However the animals were given only saline solution. In this way, 15 animals were treated up to the exacerbation phase and 15 animals were treated until the remission phase. The AV it was performed in 20 Lewis adult rats that were divided into 2 groups with 10 animals each. The first group was treated with GA (n=10) and second group was treated with saline (n=10) for 14 days. The treatment was initiated soon after the lesion. The EAE results were analyzed by immunohistochemistry (n = 5), Western Blotting (n = 5) and a qualitative analysis of spinal motoneurons and their afferents was also performed by transmission electron microscopy (n = 5). Avulsed animals (n=20) were divided into groups for the immunohistochemichal study (n=10) and for neuronal survival counting (n=10). The results showed that GA has the ability to decrease MHC class I expression in mice with EAE and in rats after AV. In this way, influences the synaptic plasticity and inflammatory processes regulation during the disease and after a mechanical injury. There was a decrease in astrocyte reactivity (GFAP-glia fibrillary acidic protein expression) and a decrease in microglial reactivity observed by Iba-1. Expression

analyses immunolabeling was more preserved after GA administration and the neuronal count performed in the AV rats also showed increased motoneurons survival. Taken together, the present results indicate that GA plays a role in the CNS by reducing the MHC class I expression in the spinal cord and environmental. Thus providing better synaptic stability and neuronal preservation during the course of EAE and CNS lesion.

LISTA DE ABREVIATURAS

AG- Acetato de glatirâmer
APC- Células apresentadoras de antígeno
AV- Avulsão
BDNF- Fator neurotrófico derivado do cérebro
BHE- Barreira hemato-encefálica
BSA- Albumina de soro bovino
CNS- Sistema Nervoso Central
EAE- Encefalomielite Autoimune Experimental
EM- Esclerose Múltipla
GA- Acetato de Glatiramer
GFAP- Proteína ácida fibrilar glial
IL- Interleucina
IFN- Interferon
MBP- Proteína básica de mielina
MET- Microscopia eletrônica de transmissão
MHC- Complexo de histocompatibilidade principal
MOG- Glicoproteína de mielina de oligodendrócitos
MS- Esclerose múltipla
PBS- Tampão salina fosfato
PLP- proteína do proteolipídio
SDS- Dodecil sulfato de sódio
SN- Sistema Nervoso
SNC- Sistema Nervoso Central
SNP- Sistema Nervoso Periférico
TBS-T- Tampão Tris-Tween20
TNF- Fator de crescimento de transformação
Th1- Células T auxiliaries 1
Th2- Células T auxiliaries 2
TNF- Fator de necrose tumoral

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Imunomarcção anti-MHC I na coluna ventral da medula espinhal
- Figura 2-Quantificação da imunomarcção anti- MHC I no surto da EAE
- Figura 3- Quantificação da imunomarcção anti- MHC I na remissão da EAE
- Figura 4- Imunomarcção anti-sinaptofisina na coluna ventral da medula espinhal
- Figura 5- Quantificação da imunomarcção anti- sinaptofisina no surto da EAE
- Figura 6- Quantificação da imunomarcção anti- sinaptofisina na remissão da EAE
- Figura 7- Imunomarcção anti-GFAP na coluna ventral da medula espinhal
- Figura 8- Quantificação da imunomarcção anti- GFAP no surto da EAE
- Figura 9- Quantificação da imunomarcção anti- GFAP na remissão da EAE
- Figura 10- Imunomarcção anti-Iba1 na coluna ventral da medula espinhal
- Figura 11- Quantificação da imunomarcção anti- Iba1 no surto da EAE
- Figura 12- Quantificação da imunomarcção anti- Iba1 na remissão da EAE
- Figura 13- Western blotting para proteína MHC I e gráfico da quantificação no surto e remissão da EAE
- Figura 14- Western blotting para proteína GFAP e gráfico da quantificação no surto e remissão da EAE
- Figura 15- Western blotting para proteína Sinaptofisina e gráfico da quantificação no surto e remissão da EAE
- Figura 16- Micrografia eletrônica de transmissão de motoneurônios medulares da coluna ventral da medula espinal no surto da EAE.
- Figura 17- Morfologia dos corpos neuronais do núcleo motor de ratos submetidos a avulsão das raízes motoras.
- Figura 18- Imunomarcção anti- sinaptofisina na coluna ventral da medula espinhal e gráfico mostrando a quantificação da imunomarcção
- Figura 19- Imunomarcção anti- GFAP na coluna ventral da medula espinhal e gráfico mostrando a quantificação da imunomarcção
- Figura 20- Imunomarcção anti- Iba1 na coluna ventral da medula espinhal e gráfico mostrando a quantificação da imunomarcção

SUMÁRIO

Resumo	x
Abstract	xii
Lista de Abreviaturas	xiv
Lista de Figuras	xv
1. Introdução	1
1.1 Esclerose Múltipla	1
1.2 Encefalomielite Autoimune Experimental	2
1.3 O Complexo de Histocompatibilidade classe I no SNC	5
1.4 Acetato de glatirâmer	7
1.5 Astrócitos e microglia	9
1.6 Avulsão das raízes motoras da medula espinhal	11
2. Justificativa	13
3. Objetivos	15
3.1 Objetivos Gerais	15
3.2 Objetivos específicos	15
4. Materiais e métodos	16
4.1 Animais	16
4.2 Indução da EAE	17
4.3 Avulsão das raízes motoras	17
4.4 Tratamento com Acetato de Glatirâmer	18
4.5 Sacrifício dos animais e processamento para Imunohistoquímica	19
4.6 Análise da Sobrevivência Neuronal	20
4.7 Sacrifício dos animais e extração de proteínas	21
4.8 SDS PAGE e Western Blotting	21
4.9 Processamento e análise dos espécimes para microscopia eletrônica de transmissão	22
4.10 Análise das secções ultra-finas	23
4.11 Análise estatística	24
5. Resultados	25
5.1 Efeitos do tratamento com AG na plasticidade sináptica durante o curso da EAE	25
5.1.1 Aumento da expressão de MHC I em animais submetidos a EAE	25
5.1.2 Diminuição da imunoreatividade para sinaptofisina em animais submetidos à EAE	28

5.1.3 Diminuição da astrogliose reativa em animais tratados com AG	31
5.1.4 Diminuição da reatividade da microglia em animais tratados com AG	34
5.1.5 Aumento das proteínas MHC I, Sinaptofisina e GFAP nos animais submetidos a EAE	37
5.1.6 Alterações ultraestruturais na medula espinhal após a EAE e tratamento com AG	42
5.2 Efeitos do tratamento com AG na plasticidade sináptica após AV da raiz motora	44
5.2.1 Influência do AG na sobrevivência neuronal após AV	44
5.2.2 Imunomarcagem de Sinaptofisina, GFAP e Iba-1 após AV e tratamento com AG	46
6. Discussão	50
6.1 Modelo animal da EAE	50
6.2 Tratamento com AG após EAE e após avulsão das raízes motoras	50
6.3 Diminuição da expressão de MHC I no tratamento com AG na EAE	51
6.4 Influência do tratamento com AG na preservação sináptica, astrogliose reativa e reatividade microglial após EAE	54
6.5 Influência do tratamento com AG na preservação sináptica, astrogliose reativa e reatividade microglial após avulsão das raízes motoras	55
7. Conclusões	57
8. Referências bibliográficas	58
9. Anexo	64
9.1 <i>Glatiramer acetate positively influences spinal motoneuron survival and synaptic plasticity after ventral root avulsion</i>	64

1. Introdução

1.1 Esclerose Múltipla

A esclerose múltipla é uma doença inflamatória e desmielinizante de caráter autoimune que afeta o SNC (1, 2), atingindo duas vezes mais mulheres que homens. Prevalece em indivíduos caucasianos, que moram longe da linha do equador e o pico de incidência é na 3ª ou 4ª década de vida. Os sintomas mais comuns são: Sinal de Lhérmitte (parestesia na região da coluna cervical), parestesia de mãos e pés, ataxia dos membros (quando há lesões cerebelares), espasticidade, fadiga, neurite óptica com conseqüente diminuição da visão e dor neuropática (3).

A EM é resultante de um ataque autoimune de linfócitos T. Patologicamente, a doença é caracterizada pela infiltração perivascular de linfócitos T do tipo CD4⁺ que produzem IL-2, interferon-gama (IFN- γ) fator de necrose tumoral- β (TNF- β). Estes promovem inflamação, ativação de macrófagos e destruição mielínica no encéfalo e medula espinhal (4, 5). Devido à quebra da Barreira Hemato-encefálica (BHE), as células T auto-reativas invadem o SNC e iniciam uma resposta inflamatória, que resulta na proliferação de astrócitos reativos, perda de axônios e oligodendrócitos, causando diversos distúrbios neurológicos (4).

As lesões da EM são caracterizadas pelo desenvolvimento de placas desmielinizantes, sendo que estas apresentam diferentes formações, dependendo do estágio da doença. Placas agudas apresentam infiltrados de linfócitos T e macrófagos acompanhados de atividade endotelial, edema, inchaço da mielina e perda de oligodendrócitos. Já placas de atividade crônicas e ativas apresentam

linfócitos nas regiões perivasculares e na zona de desmielinização. Placas crônicas e inativas apresentam uma cicatriz glial, redução do infiltrado inflamatório com poucos macrófagos, linfócitos e persistente presença de monócitos, células plasmáticas e células T. Há uma demarcação na margem de lesão com o tecido apresentando mielinização normal. Nos locais das placas há gliose, redução ou ausência de oligodendrócitos e perda axonal (1).

1.2 Encefalomielite autoimune experimental

O método de indução da Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE) tem sido estudado há muitos anos, desde as vacinas de Pasteur. As primeiras observações vieram dos efeitos colaterais da pós-vacinação para encefalomielite. Esta reação provocava uma resposta contra antígenos neuronais e estudos da época foram realizados em macacos (6). Em 1947, Olitsky e Yager (7) descreveram a indução de EAE em ratos albinos, estabelecendo a EAE como modelo para doenças autoimunes e inflamatórias do SNC.

Atualmente a EAE pode ser induzida em macacos, porcos, ratos ou camundongos. A doença pode se apresentar monofásica, com um episódio agudo de paralisia, seguido de completa recuperação, ou apresentar-se no modo remitente/recorrente, que envolve ciclos múltiplos de inflamação, havendo recuperações parciais entre os surtos (8).

A EAE pode ser induzida de variadas formas. Contudo, alguns antígenos têm sido largamente utilizados como a proteína básica de mielina (MBP), a proteína do proteolipídio -PLP- ou a glicoproteína da mielina de oligodendrócitos (MOG). Esta última apresenta um forte potencial encefalitogênico em camundongos sendo,

portanto, a mais utilizada para a imunização desses animais; também apresenta maior habilidade de produzir respostas específicas de células T no SNC (9-12).

A indução da EAE em camundongos C57BL/6 pode ser realizada com o peptídeo 35-55 de MOG (MOG₃₅₋₅₅), sendo este o menor componente miélinico do SNC que atua como antígeno e induz respostas de células T e B. Este modelo produz áreas de infiltrado inflamatório mononuclear na periferia da substância branca da medula espinhal, associado com desmielinização local. Nesses infiltrados há macrófagos, linfócitos B e células T $\alpha\beta$ (alfa beta) e células T $\gamma\delta$ (gama delta) (13).

Observando-se o processo inflamatório na EAE há um acúmulo de leucócitos no espaço perivascular, envolvendo vesículas do neurópilo, meninges e plexo coronóide, há interações com o endotélio, quebra da BHE e o afluxo de leucócitos da corrente sanguínea para o espaço perivascular (14, 15).

Os linfócitos T CD4⁺, particularmente, têm se apresentado como um dos principais causadores para a indução da EAE. Contudo, após a indução da doença, outros tipos celulares de células mostram-se importantes para a expressão da doença. Observou-se que as células T auto-reativas são ativadas na periferia, proliferando no tecido linfóide periférico e depois migram para o SNC (16, 17).

Embora a ativação de células T CD4⁺ seja um dos principais fatores para o sucesso da indução da EAE, também células de linhagem macrófágicas como células microgliais residentes no SNC e infiltrados de monócitos sanguíneos são responsáveis pela destruição tecidual e desmielinização. Essas células requerem

informações das células T CD4+ sob forma de liberação de citocinas para serem ativadas (18, 19).

A inflamação e a desmielinização é reduzida quando o camundongo recupera os sinais clínicos e, portanto, inicia-se um processo de resolução das mudanças histopatológicas (20).

A fase de remissão da EAE parece estar correlacionada com o aumento dos níveis do mRNA de IL-4 e IL-10 no SNC (21, 22). A administração de IL-4 apresentou efeitos benéficos na remissão da doença.(23) A IL-10 parece ter um papel dominante na regulação da EAE em camundongos que sofreram a forma não remittente da doença (24, 25). Em outro estudo, camundongos transgênicos para IL-10 são protegidos da doença (24, 26). Tanto IL-4 quanto IL-10 são produzidas por células Th2, importantes para a função de melhora dos sinais clínicos (27).

O fator de crescimento tumoral β (TGF- β) também apresenta função regulatória na EAE, já que sua administração reduz a severidade da doença (23, 28). Acredita-se que tais efeitos possam advir da inibição da expansão de células T e/ou a inibição direta da atividade dos macrófagos nos focos de lesão, controlando a resposta inflamatória (29).

Como anteriormente mencionado, a EAE apresenta uma complexa rede de citocinas envolvidas com a doença. O estudo recente de Menges et al (30) mostrou que a administração *in vitro* de MOG 35-55 e TNF- α em células dendríticas conseguiu proteger camundongos da EAE. As células dendríticas conduziram uma expansão da população de células T CD4+ que produzem IL-10.

No entanto, o uso de IL-10 bloqueia apenas parcialmente a susceptibilidade a EAE.

1.3 O complexo de histocompatibilidade principal de classe I no SNC

O complexo de histocompatibilidade principal (MHC) é um conjunto de proteínas especializadas, que são codificadas por genes altamente polimórficos. Eles têm como função no sistema imunológico apresentar antígenos ligados às células para serem reconhecidas pelas células T. Existem 2 tipos principais de produtos dos genes de MHC, chamado moléculas de classe I, que apresentam peptídeos aos linfócitos citolíticos CD 8⁺ e as moléculas de classe II que os apresentam às células T auxiliares CD 4⁺ (5).

O MHC I apresenta em sua estrutura uma cadeia pesada, chamada microglobulina beta-2 e 9-11 aminoácidos gerados de degradação proteossomal (31).

Acreditava-se que os neurônios não seriam capazes de expressar algumas moléculas do Sistema Imunológico, como o MHC, pois o SNC seria considerado “imunoprivilegiado”, já que a BHE é uma proteção contra agentes patógenos. Porém, novos estudos provaram a existência dessa molécula em sinalizações neurais e mudanças dependentes da conectividade sináptica (31).

Demonstrou-se que o MHC I é expresso por neurônios e que essa expressão é importante para o desenvolvimento do cérebro adulto e o nível de MHC I pode ser regulado por atividade elétrica endógena e exógena. Outros estudos também observaram que o MHC I é importante para o desenvolvimento plasticidade adulta

em uma resposta a lesões. Assim, surge um novo papel para a molécula de MHC I no SNC (32, 33).

Há alguns anos, Huh e colaboradores demonstraram, em estudo que camundongos transgênicos (incapazes de expressar MHC I), apresentavam uma falha no processo de segregação das aferências provenientes da retina para o corpo geniculado lateral, durante o processo de desenvolvimento do Sistema visual, ou seja, não havia uma remoção das conexões sinápticas extranumerárias durante o desenvolvimento (34).

Seguindo essa pesquisa Oliveira e colaboradores, investigaram em camundongos deficientes para a expressão da proteína microglobulina beta-2 (subunidade do complexo de MHC) a hipótese de que a eliminação sináptica, após uma axotomia do nervo isquiático fosse também dependente da presença do MHC I. Como resultado, observou-se que animais deficientes para a microglobulina beta-2 apresentaram maior eliminação sináptica, principalmente nos terminais inibitórios, comparado com os animais normais (C57BL/6). Este resultado mostra que a expressão de MHC I é necessária na estabilização seletiva de sinapses inibitórias, ajudando para que o processo de retração ocorra de forma específica (32).

Outro estudo sobre a capacidade regenerativa e a expressão de MHC I realizado com diferentes linhagens de camundongos, demonstrou que camundongos C57BL/6, que expressam relativamente menor quantidade de MHC I, apresentam menor potencial regenerativo e menor porcentagem de destacamento sináptico após lesão nervosa comparando-se com animais A/J, que

expressam maior quantidade de MHC I e apresentam melhor capacidade regenerativa e maior taxa de retração sináptica (35).

Interessantemente, estudos têm mostrado que a expressão do MHC I é um importante fator para a resposta neuroglial na axotomia periférica, afetando o processo de plasticidade sináptica (32). É possível que a expressão de certos níveis da molécula de MHC-I pelos neurônios também seja reconhecida pela glia, ativando assim uma série de respostas que asseguram a homeostase, bem como resultem em uma gliose reativa associada à eliminação sináptica (36).

1.4 Acetato de glatirâmer (AG)

O acetato de glatirâmer (AG; Copaxone) é uma mistura sintética composta de polipeptídeos com uma seqüência de 4 aminoácidos - ácido L-glutamina, L- lisina, L-alanina e L-tirosina (23). Esse medicamento é uma droga imunomoduladora, aprovada para a utilização em indivíduos humanos com EM do tipo remitente-recorrente. Muitos estudos se dedicaram a explicar o mecanismo de ação do AG (23, 37). O principal ponto que indica a eficácia do medicamento mostra que ele reativa células imunoregulatórias do tipo Th2 (38).

A resistência à EAE e a recuperação dos sinais clínicos da doença é regulada pelo aumento de citocinas do tipo Th2 secretadas no SNC pelas células T regulatórias CD4⁺CD25⁺ e células B. A redução do número e a severidade dos surtos da EM ocorre no tratamento com o AG, ele também induz adicionalmente, a expressão de citocinas antiinflamatórias e BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), estimula a microglia e astrócitos a expressarem IL-10 e TGFβ (Fator de crescimento e transformação-β), favorecendo uma resposta imune do tipo Th2.

Esses resultados indicam que o AG colabora com a neuroproteção e regeneração de elementos neurais no SNC (39-42).

Segundo o estudo de Blanco e colaboradores (43), o tratamento de pacientes com AG por 24 meses promoveu uma diminuição de citocinas pró-inflamatórias como $\text{INF-}\gamma$ e IL-2 produzidas pelas células T CD4+ e CD8+. Essas mudanças foram associadas com o aumento de células T CD4+CD45RA+ e CD3+ e da produção de BDNF.

Kayhan e colaboradores (44) mostraram que o óxido nítrico também é um importante mediador envolvido na EAE e na EM. O tratamento com AG resultou numa diminuição dos níveis dessa molécula, apresentando uma atenuação dos sintomas da doença. A secreção de óxido nítrico induzido pela citocina IL-1 β apresentou diminuição, embora os níveis de óxido nítrico modulados pela IL-10 e IL-13, tenham aumentado. O AG também induz um aumento na produção de IL-10 pelos linfócitos T (37, 42).

Recentemente, um estudo mostrou que o AG tem a capacidade de afetar o processo de desmielinização e remielinização de camundongos com EAE, já que o AG aumenta a proliferação, diferenciação e sobrevivência das células progenitoras de oligodendrócitos (45).

O AG é um imunomodulador e apresenta um mecanismo de ação diferente dos outros medicamentos, pois ele inicialmente apresenta uma forte ligação com o MHC e, conseqüentemente, gera uma competição com os vários antígenos de mielina para a apresentação para as células T. Assim, ocorre uma modificação na freqüência com que a doença apresenta seus sintomas no paciente,

provavelmente afetando as propriedades das células apresentadoras de antígeno como monócitos e células dendríticas.

1.5 Astrócitos e microglia

Os astrócitos e a microglia são células gliais do SNC. Os astrócitos estão intimamente associados aos vasos sanguíneos e seus finos processos ficam em contato com a face vascular. O processo de interação entre os astrócitos e as células endoteliais ocorre bilateralmente, pois as células endoteliais são fundamentais no papel de regulação e maturação dos astrócitos, que tem uma importante função na formação e manutenção da BHE, protegendo o SNC (46, 47).

Alguns trabalhos mostram que os astrócitos expressam moléculas de MHC II e podem servir como células apresentadoras de antígeno (APC) para linfócitos CD4+ durante a fase inflamatória inicial da EM (48, 49). Não obstante, os astrócitos podem também apresentar um papel neuroprotetor, tendo-se em vista que se comunicam com os neurônios através da liberação de ácido glutâmico, por outro lado durante a isquemia ou processo inflamatório há um excesso de liberação de glutamato e os astrócitos são capazes de prevenir a morte neuronal pela excitotoxicidade. Os astrócitos também regulam o pH e a concentração de potássio no meio extracelular, promovem suporte físico para os neurônios e também isolam sinapses, limitando a dispersão de neurotransmissores (50).

Os astrócitos apresentam um importante papel na formação da cicatriz glial após uma lesão do SNC ou morte celular, pois rapidamente respondem com o aumento de GFAP (proteína ácida fibrilar glial), associada com a astrogliose (48). Também

há o aumento do reparo tecidual e mudança na composição da matriz extracelular, inibidores de proteases, fatores tróficos e citocinas. No caso de lesão mecânica, os astrócitos se tornam hipertróficos nas margens do foco da injúria e estendem numerosos processos finos entre si (51). Eles também apresentam função relacionada à diminuição da intensidade de respostas pró inflamatórias, pois produzem várias citocinas imunossupressoras, incluindo-se o TGF β (48), a IL 10 (52, 53), o INF α (54) e o IFN β (55). O desenvolvimento da EAE está fortemente associado às células Th1. Assim, foi demonstrado que várias citocinas relacionadas à resposta do tipo Th1 são aumentadas durante a fase aguda ou na fase de recorrência dos sinais clínicos, porém isso não ocorre na fase de remissão (56, 57).

Tanto a microglia derivada do SNC, quanto macrófagos vindos do sangue, são fundamentais no estágio da desmielinização autoimune da EAE e EM. Eles têm um importante papel como células apresentadoras de antígeno (58) e secundariamente no recrutamento de células T, granulócitos e macrófagos. Também produzem uma série de substâncias potencialmente danosas, como o óxido nítrico, TNF α , IL-1 β . A IL-1 β mostrou que, em cultura de células gliais, é capaz de ativar a produção de glutamato, que em quantidades aumentadas causa morte de células oligodendrogliais (59). Da mesma forma, o óxido nítrico está caracteristicamente associado a lesões inflamatórias (60-63).

O infiltrado de macrófagos no SNC e a ativação da microglia são provavelmente a principal fonte de liberação da grande quantidade de glutamato após ativação *in vitro*. A excitotoxicidade pode ser um importante fator para EM e EAE, sendo que altos níveis de glutamato foram observados no líquido cerebrospinal de

pacientes com EM. A inflamação associada à EM gera um aumento dos receptores de glutamato nos axônios no centro das lesões do SNC e na vizinhança, ativando os astrócitos (64). Tal fato pode predispor essas células aos danos excitotóxicos derivados da glia. Danos axonais são particularmente intensos nos primeiros estágios da doença (65).

A microglia tem como função a remoção, por fagocitose, de células lesadas. Na esclerose múltipla (EM), as células mielínicas são largamente lesionadas, resultando em uma perda da cobertura axonal da substância branca do SNC. Ainda, essas células apresentam um papel importante na indução da fase de remissão da doença (66).

Além de ser uma fonte de fatores neurotóxicos de ativação, a microglia tem sido implicada na iniciação e progressão da EM, tendo como alvo a mielina (67). Segundo estudo de Matsumoto e colaboradores, análises imunoistoquímicas feitas em ratos Lewis, submetidos à EAE mostraram que, no surto da doença, houve maior proliferação da microglia, e nas remissões houve a formação de tecido cicatricial, devido à astrogliose (68).

1.6 Avulsão das raízes motoras da medula espinhal

As lesões traumáticas que acometem a medula espinhal e envolvem morte neuronal, geram uma perda permanente de função. Um modelo experimental para investigar a degeneração neuronal adulta é a avulsão das raízes nervosas (AV), que consiste no arrancamento das raízes motoras da superfície da medula espinhal, causando uma desconexão entre o corpo neuronal e o alvo muscular. A proximidade da lesão e sua localização na interface do SNC e do SNP, resulta em

uma perda neuronal de até 80% durante as 2 primeiras semanas pós lesão (69-71).

Adicionalmente, após a lesão pode ser observado edema do corpo celular, deslocamento do núcleo para a periferia da célula e dissolução da substância de Nissl. Durante a AV nota-se uma reação inflamatória local, com vigorosa ativação da glia residente, podendo afetar circuitos espinhais, gerando uma perda aguda e reorganização das sinapses (71). Todas essas alterações presentes nos corpos celulares dos neurônios são chamadas em conjunto de cromatólise (72).

Lesões axonais no SNC e no SNP resultam em degeneração retrógrada e morte celular. Assim alguns fatores podem influenciar a evolução e severidade desse processo, como a distância entre o sítio da lesão e o corpo do neurônio, a localização dos neurônios axotomizados e a idade do animal. A maioria dos neurônios localizados no SNC degenera após uma axotomia proximal. Já neurônios localizados no SNP geralmente sobrevivem e regeneram (73).

Devido a todas essas alterações conhecidas, novos tratamentos exógenos com drogas e fatores neurotróficos podem influenciar positivamente a sobrevivência neuronal e a regeneração axonal (71). Recentemente, um estudo mostrou que a massiva perda sináptica dos neurônios motores isquiáticos durante o curso da EAE contribui para a origem dos sinais clínicos da doença, abrindo, portanto, uma possibilidade para o papel das drogas imunomoduladoras na sobrevivência neuronal e para estabilização das redes sinápticas (74).

2. Justificativa

A esclerose múltipla (EM) é uma doença inflamatória crônica, auto-imune, que afeta o SNC. Caracteriza-se pela desmielinização focal e grau variado de perda axonal. Ocorre em adultos jovens, principalmente no sexo feminino e na raça branca. Há locais com alta prevalência da doença, como no norte da Europa, Estados Unidos, sul do Canadá, normalmente países afastados da linha do equador. Acredita-se que atualmente 2-5 milhões de pessoas no mundo sofram da doença (75). A EAE é um modelo experimental da doença, podendo ser aplicado em diferentes espécies de animais.

A avulsão de raízes motoras da medula espinhal é uma lesão mecânica que provoca degeneração de neurônios motores e intensa atividade astrogliar no microambiente lesionado. Os motoneurônios que sobrevivem à lesão podem se regenerar após um reimplante de raiz nervosa. Porém isto normalmente não é suficiente para a recuperação. Assim, novas terapias farmacológicas estão sendo adotadas em situações de morte neuronal, visando a neuroproteção das células lesadas. Essa alternativa pode ser também ser utilizada em doenças neurodegenerativas como a esclerose múltipla.

O AG é um medicamento utilizado em indivíduos com EM e tem como função reduzir a frequência das remissões da doença, induzindo respostas de células Th2 e aumentando a expressão de citocinas anti-inflamatórias (76).

As moléculas de MHC classe I apresentam mecanismos de comunicação e sinalização entre neurônios e glia no SNC, lesões como a EAE e a avulsão provocam modificações no microambiente medular e o conhecimento dos meios

de comunicação das células nervosas é muito importante para a modulação das respostas frente aos danos do SNC.

Portanto este trabalho investigou a plasticidade sináptica, a astrogliose reativa relacionando com a expressão de MHC de classe I. Também a sobrevivência neuronal dos animais avulsionados sob ação do AG foi investigada. Acreditamos que os resultados provenientes deste estudo possam auxiliar no refinamento das atuais estratégias de tratamento da EM e lesões traumáticas.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito neuroprotetor e de modulação da expressão da molécula de MHC I pelo Acetato de Glatirâmer em animais com EAE ou submetidos à avulsão de raízes motoras.

3.2 Objetivos Específicos

- A) Correlacionar a expressão do MHC I com a densidade sináptica através da expressão de sinaptofisina.
- B) Verificar a astrogliose reativa nas adjacências dos motoneurônios com expressão de GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*).
- C) Analisar a reatividade microglial através da imunomarcação anti-IBA-1.
- D) Quantificar a expressão de GFAP, IBA-1, sinaptofisina e MHC-I, através de Western blot.
- E) Realizar um estudo ultra-estrutural qualitativo das sinapses em aposição ao corpo celular e dendritos proximais de motoneurônios alfa no surto e remissão da EAE.
- F) Analisar o impacto do tratamento com AG na sobrevivência neuronal durante o período agudo após avulsão das raízes motoras.

4. Material e métodos

4.1 Animais

Foram utilizados neste trabalho camundongos C57BL/6J (20-25g), fêmeas com 7 semanas para a indução da EAE. Para a avulsão de raízes motoras medulares foram utilizados ratos inbred da linhagem LEWIS/H(~250g), fêmeas com 8 a 10 semanas. Os animais foram obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas. Todos os experimentos foram conduzidos seguindo-se as normas de ética na experimentação animal, tendo sido aprovados pela comissão de ética na experimentação animal CEEA-IB-UNICAMP, protocolo número 1316-1.

Os camundongos submetidos a EAE foram divididos em 5 grupos: Controle (sem a doença); EAE tratados com placebo (solução salina) e sacrificados durante o surto; EAE tratados com AG e sacrificados no surto; EAE tratados com placebo e sacrificados na remissão; EAE tratados com AG e sacrificados na remissão. Em cada grupo havia 15 animais, pois 5 deles foram submetidos à análise por imunoistoquímica, 5 à análise por Western Blotting e 5 animais para análise de microscopia eletrônica de transmissão.

Os Ratos (n=20) foram divididos em 2 grupos. O primeiro foi tratado com AG e o segundo foi tratado com placebo (solução salina) por 14 dias após a avulsão. Os animais tiveram as raízes nervosas motoras, na região da intumescência lombar do lado direito, avulsionadas. O lado não avulsionado de cada animal foi utilizado como controle para a análise dos resultados. Dentro de cada grupo, 10 animais

foram utilizados para a realização da imunoistoquímica e 10 animais para a contagem de sobrevivência neuronal.

4.2 Indução da EAE

A EAE foi induzida utilizando-se peptídeo MOG₃₅₋₅₅ diluído em tampão fosfato de sódio (PBS pH 7.4 - 0,1M) e *Mycobacterium tuberculosis* (1,5 mg/ml; Difco) emulsificada com adjuvante completo de *Freud*. As aplicações foram realizadas bilateralmente na base da cauda de cada animal, contendo 50µl aplicados de cada lado. 200 ng de toxina *Pertussis* foram injetados por animal por via intraperitoneal no dia da imunização e 48 horas mais tarde.

Os animais foram avaliados diariamente para a verificação de sinais neurológicos da doença, utilizando-se uma escala funcional descrita na tabela abaixo:

Tabela 1: Classificação dos graus da EAE segundo Kerfoot e Kubes (77), que dividiram os sinais clínicos da doença em escala de 0 a 4, sendo organizada de forma crescente aos sinais clínicos.

Score EAE	Sinais clínicos
0	Ausência de sinais clínicos
1	Flacidez de cauda com paralisia
2	paralisia da cauda e fraqueza nos membros posteriores
3	paralisia dos membros posteriores
4	paralisia dos membros posteriores e fraqueza dos membros anteriores.

4.3 Avulsão das raízes motoras

Os animais foram anestesiados (60 mg/Kg de quetamina e 10mg/kg de xilasina; 1:1 i.p), e tricotomizados. Em seguida, iniciou-se o processo cirúrgico com uma incisão dorsal paralela à coluna vertebral, na região torácica. A musculatura eretora da coluna vertebral foi então removida para a exposição das vértebras torácicas e uma laminectomia foi realizada em aproximadamente 3 vértebras, para que a intumescência lombar fosse exposta. A dura mater foi seccionada longitudinalmente e as raízes dorsais e ventrais localizadas e identificadas. Então, o procedimento de avulsão foi realizado nas raízes nervosas ventrais do lado direito, utilizando-se uma pinça tipo relojoeiro (n° 4). Nesse procedimento três raízes nervosas foram avulsionadas: L4, L5 e L6. Encerrados os procedimentos cirúrgicos, a musculatura e a pele foram suturados e os animais mantidos em biotério por um período de 14 dias sendo tratados com placebo ou AG.

4.4 Tratamento com acetato de Glatiramer (Copaxone)

Os camundongos induzidos com a EAE foram tratados diariamente, com uma dose subcutânea de 0,05 mg/animal de uma solução contendo AG em tampão fosfato de sódio (PBS pH7.4 - 0,1M), por um período de 13 dias após a indução da EAE. Outro grupo de camundongos induzidos com EAE foram tratados com uma solução salina (placebo) e o grau clínico desses animais foi avaliado diariamente e quando entraram no surto da doença (13 dias após a indução) todos os animais de ambos os grupos foram sacrificados.

Quanto aos camundongos que foram tratados até a fase de remissão da doença, o AG foi aplicado diariamente por 21 dias após a indução da doença; e

outro grupo de camundongos foi tratado com solução salina pelo mesmo período de 21 dias após indução. Nesse período foi possível observar melhora do quadro clínico desses animais.

Os ratos avulsionados foram tratados diariamente, com uma dose de 0,5 mg/animal de AG por um período de 14 dias após a cirurgia. Outro grupo tratado pelo mesmo período com uma solução salina (placebo), constituiu o controle. Todos os animais foram sacrificados no 14º dia após a cirurgia.

4.5 Sacrifício dos animais e processamento para imunoistoquímica

Todos os animais foram sacrificados com uma overdose de anestésico e em seguida submetidos à toracotomia e perfundidos transcardíacamente, com auxílio de uma bomba peristáltica (mini-Pump Variable Flow-VWR), com solução de salina tamponada (NaCl 0,9% em tampão fosfato de sódio, pH 7,4), visando a lavagem total dos vasos e órgãos. Para a fixação foi realizada a perfusão com uma solução contendo formalina (formaldeído 10%) em tampão fosfato de sódio, pH 7,4. As intumescências lombares das medulas espinhais foram então retiradas, preservando sua morfologia.

Depois dos espécimes dissecados e mantidos em fixador por 12 horas a uma temperatura de 4°C, as medulas e raízes nervosas foram congeladas e incluídas em Tissue-Tek (Miles Inc., USA). Os cortes histológicos com 12 µm de espessura foram obtidos em criostato.

Para a realização da imunoistoquímica, as lâminas foram climatizadas e imersas em PBS 0,01M, sendo posteriormente incubadas em câmara úmida com 150µl de solução (BSA 3% e Triton X 0,025%) em PBS por 30 minutos. A seguir foram

aplicados os anticorpos primário, sendo o período de incubação de 18 horas. Foram empregados os seguintes anticorpos primários: anti-sinaptofisina, anti-GFAP (glial fibrillary acidic protein), anti-Iba1 e anti-MHC-I. Em seqüência à primeira incubação, as lâminas foram lavadas em PBS 0,01M e incubadas com os anticorpos secundários conjugados com cianina (CY)-2 e/ou CY-3 (Jackson Lab; USA) por 45 minutos. Os espécimes foram lavados em PBS 0,01M e montados em glicerol/PBS 0,01M (3:1), sendo observados por microscopia de fluorescência (Nikon, Eclipse TS100).

4.6 Análise da Sobrevivência neuronal

Para a contagem de neurônios foram realizados cortes congelados, obtidos em criostato, da intumescência lombar da medula espinhal. Os cortes foram obtidos de forma alternada e corados com cresil violeta (coloração de Nissl). A contagem dos motoneuronios foi feita no núcleo motor dorso-lateral do corno anterior da medula espinhal do lado ipsilateral (lesionado) e contralateral (não lesionado) em vinte secções, ao longo da intumescência lombar, sendo o intervalo entre eles de 48 µm. Apenas as células com o núcleo e nucléolo visíveis foram contadas. Para corrigir eventuais contagens duplas de neurônios, devido ao fato de um mesmo núcleo poder estar presente em duas secções, foi utilizada a fórmula de Abercrombie (78).

$$N=nt/(t+d)$$

Em que N é o valor corrigido de neurônios, n é o número de células contadas, t é a espessura entre uma secção e outra (48 µm) e d é o diâmetro médio do núcleo (20

µm). O diâmetro médio do núcleo foi calculado a partir de 30 neurônios distribuídos aleatoriamente em 3 secções representativas diferentes ao longo da intumescência lombar. A porcentagem de sobrevivência neuronal foi determinada, sendo esta definida como a razão percentual entre o número de motoneurônios ipsilateral e contralateral para cada grupo.

4.7 Sacrifício dos animais e extração de proteínas

O sacrifício dos camundongos para a extração de proteínas e a retirada das medulas foi realizado da mesma forma descrita para Imunoistoquímica. Contudo, os animais foram perfundidos apenas com a solução salina tamponada (NaCl 0,9% em tampão fosfato de sódio, pH 7,4), não sendo utilizado o fixador. As amostras medulares extraídas ao nível da intumescência lombar foram homogeneizadas por 1 minuto (Polytron; Kinematica) em uma solução 50µL/mg contendo 150 mM de NaCl, 0,5% Triton X100, 0,5mg EDTA/mL e 10µL/mL do coquetel inibidor de proteases (Sigma cat.no. P-8340). Após, foram submetidas a uma centrifugação de 10.000g por 10 minutos e a quantidade de proteína de cada amostra foi quantificada pelo método de Bradford.

4.8 SDS-PAGE e Western Blotting

As amostras protéicas foram fervidas por 5 minutos em tampão de amostra com condição redutora. Foram aplicados de 30 a 80µg do extrato total de proteínas das amostras no Gel de Poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE) a 10%, sendo a corrente elétrica utilizada na eletroforese de 100V. Após a eletroforese, o material foi transferido eletricamente (Sistema Hoefer) para membranas de nitrocelulose

(Amersham) sob corrente constante de 400mA em cuba refrigerada. A qualidade da transferência de proteínas foi analisada pela coloração das membranas com Ponceau S 0,5% em ácido acético 1%. As membranas foram bloqueadas com leite desnatado a 5% em TBS-T por uma hora sob agitação à temperatura ambiente. Em seguida, foram incubadas por um período de 18 a 24 horas com leite seco desnatado 1% em TBS-T contendo os seguintes anticorpos: Rato anti-MHC classe I (Península), cabra anti-GFAP (Dako) e coelho anti-sinaptofisina (Dako). A seguir, as membranas foram lavadas com TBS-T e incubadas com anticorpos secundários anti-coelho e anti-rato marcados com peroxidase por 45 minutos. Após nova série de lavagens, a atividade peroxidásica foi revelada através de sistema ECL (Amersham), expondo a membrana ao filme X-Omat (Kodak) por no máximo 3 minutos. A intensidade de marcação obtida nas diferentes situações foi determinada por densitometria das bandas, utilizando o programa Kodak 1D (Scientific Imaging Systems).

4.9 Processamento e análise dos espécimes para microscopia eletrônica de transmissão (MET).

Os camundongos foram submetidos à toracotomia e perfusão, como já descritos no tópico 4.5, porém o fixador utilizado para MET foi uma solução contendo glutaraldeído (2%) e paraformaldeído (1%) em tampão fosfato de sódio. Depois de dissecadas, as medulas permaneceram imersas nesta mesma solução fixadora por 12 horas e mantidas a 4°C. Depois foram lavadas 3 vezes em solução tampão PB 0,01M, pH7,4 e seccionadas longitudinalmente, através de sua fissura mediana ventral. Estes espécimes foram então pós-fixados por um período de 2

horas em solução de tetróxido de ósmio a 1%, diluído em tampão fosfato de sódio, pH 7,38.

Seguindo-se à pós-fixação, os fragmentos foram lavados em água destilada e desidratados em série crescente de álcool e acetona, sendo incluídos em resina (EPSON, SEM).

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, a coluna ventral da medula espinhal foi identificada e os blocos foram retrimados para isolamento da região com os motoneurônios a serem analisados. Após essa identificação iniciou-se a confecção dos cortes ultra-finos (500Å; ultramicrotomo LKB, Bromma 8800) os quais foram coletados em telas de cobre ("single slot grid" recobertos com formvar) e depois contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo. Os espécimes foram observados ao microscópio eletrônico (Leo 906, Zeiss) operando a 60KV

4.10 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 motoneurônios pela presença de terminais nervosos do tipo C. A superfície dos motoneurônios foram então fotografadas em um aumento de 10.000X e 21.560X empregando-se uma câmera de alta resolução (morada soft imaging system).

4.11 Análise estatística dos resultados

Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão. A análise foi realizada através dos testes U de Mann Whitney para dados não-paramétricos e t de student, para dados paramétricos. Em todas as análises foram consideradas significâncias mínimas de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (**).

5. Resultados

5.1 Efeitos do tratamento com AG na plasticidade sináptica durante o curso da EAE

5.1.1 Aumento da expressão de MHC I em animais submetidos a EAE

O efeito do AG na expressão de MHC I dos animais submetidos à EAE é demonstrado na figura 1, em que se observa a imunoreatividade na região do núcleo motor da coluna ventral da medula espinhal. As figuras 1 A e 1 D mostram os animais normais sem a indução da doença, ou seja, controle. As figuras 1 B e 1 C demonstram os animais induzidos à EAE tratados com placebo e tratados com AG, respectivamente. Durante a fase de surto da doença observa-se que os animais tratados com AG apresentam menor expressão de MHC I em relação ao placebo, mostrando que o AG é capaz de modular a expressão de MHC I no SNC.

As figuras 1 E e 1 F representam a fase de remissão da doença. Nota-se uma diminuição da expressão de MHC I em ambos os grupos nesta fase, o que também coincidiu com a redução dos sinais clínicos.

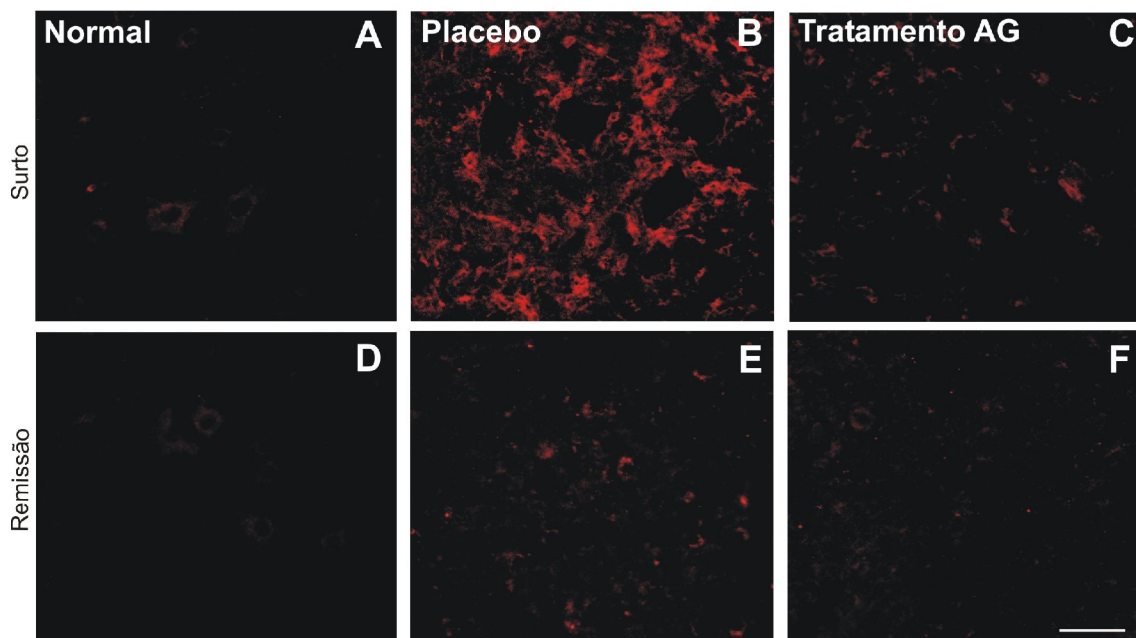


Figura 1: Imunomarcção anti-MHC I na coluna ventral da medula espinhal de animais com EAE nas fases de Surto (**A a C**) e Remissão da doença (**D a F**). **A-D** animais normais, sem a doença, **B-E** animais doentes tratados com placebo e **C-F** animais doentes tratados com AG, respectivamente. Note o aumento da expressão de MHC I especialmente no grupo placebo durante surto da doença. Escala =50 μ m.

Os animais tratados com placebo durante o surto da doença apresentaram significativo aumento da imunomarcção de MHC I em relação ao grupo tratado com AG e ao grupo normal, (normal, $7,69 \pm 1,08$; placebo, $13,18 \pm 0,93$; tratado, $9,83 \pm 0,83$; $p < 0,05$, Figura 2).

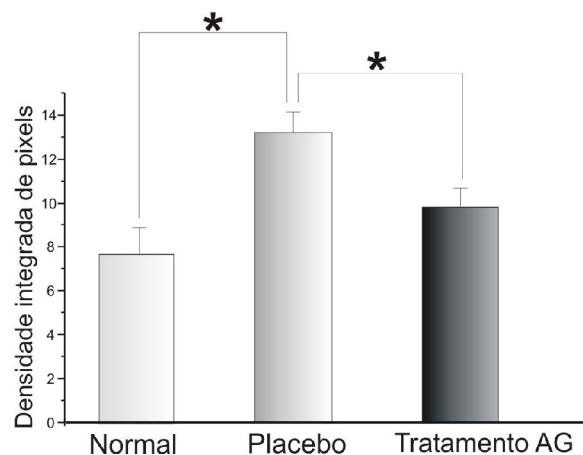


Figura 2: Representação gráfica de densidade integrada de pixels para a imunomarcção anti-MHC na coluna ventral da medula espinhal de animais normais, doentes tratados com placebo e doentes tratados com AG, durante a fase de **surto** da doença, * $p < 0.05$, teste de Mann Whitney.

Durante a remissão da doença percebe-se que há uma diminuição da expressão de MHC I no grupo tratado com placebo e também uma diminuição do grupo tratado com AG. Nota-se uma diferença estatística significativa entre o grupo tratado com placebo em relação com o grupo normal e o grupo tratado com AG (normal, $7,69 \pm 1,08$; placebo, $10,0 \pm 0,23$; tratado, $8,32 \pm 0,26$; $p < 0,05$, Figura 3).

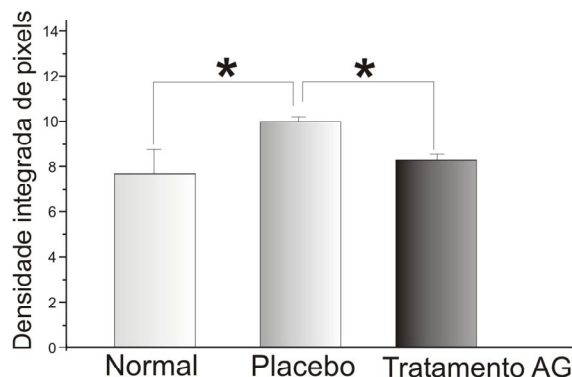


Figura 3: Representação gráfica de densidade integrada de pixels para a imunomarcção anti-MHC na coluna ventral da medula espinhal de animais normais, doentes tratados com placebo e doentes tratados com AG, durante a fase de **remissão** da doença. * $p < 0.05$, teste estatístico t de Student.

5.1.2 Diminuição da imunoreatividade para sinaptofisina em animais submetidos a EAE

A imunoreatividade para a proteína sinaptofisina, no núcleo motor da coluna ventral da medula espinhal, está representado na figura 4. As figuras 4 A e 4 D representam animais normais, sem a doença. As figuras 4 B e 4 C mostram os animais na fase de surto da doença, sendo tratados com placebo e tratados com AG, respectivamente. Observa-se que os animais tratados com placebo apresentaram uma grande perda sináptica em relação aos tratados com AG, que mantiveram uma melhor estabilidade sináptica.

Já as figuras 4 E e 4 F apresentam os animais na fase de remissão da doença, tratados com placebo e tratados com AG. As setas indicam os motoneurônios medulares. É possível observar, nessa fase da doença, que as sinapses de ambos os grupos apresentaram uma melhor preservação em relação ao surto. Tal fato

apresentou correlação com a diminuição dos sinais clínicos e também a diminuição da expressão de MHC I.

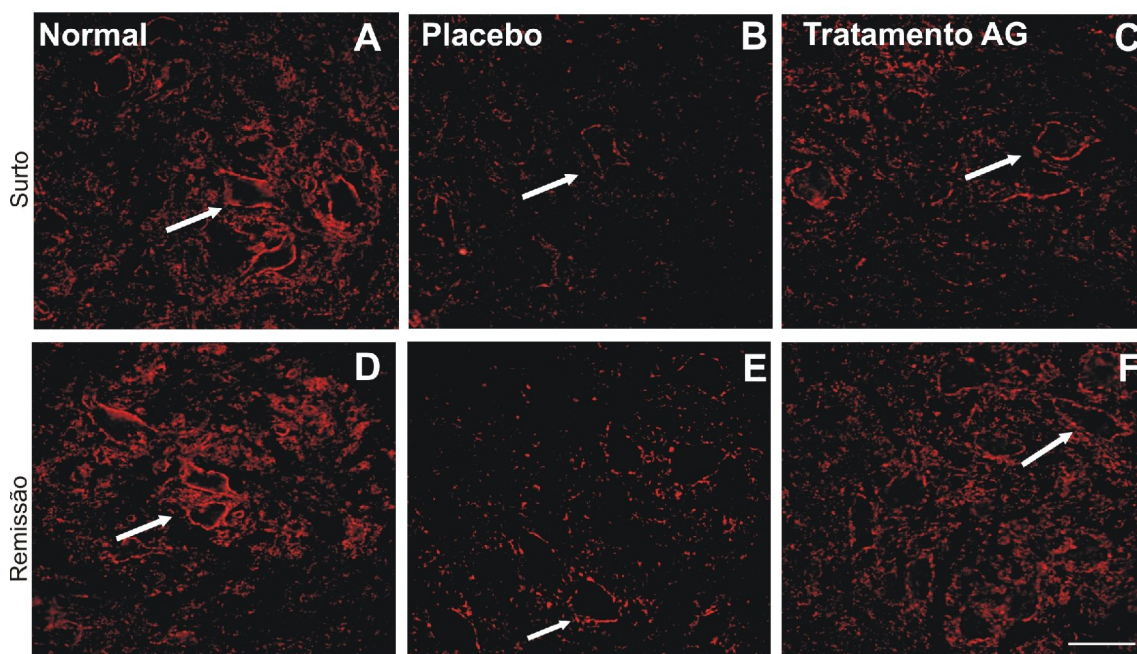


Figura 4: Imunomarcação anti-sinaptofisina na coluna ventral da medula espinhal de animais com EAE nas fases de Surto (**A a C**) e Remissão da doença (**D a F**). **A-D** animais normais, sem a doença, **B-E** animais doentes tratados com placebo e **C-F** animais doentes tratados com AG, respectivamente. Nota-se a maior perda de contatos sinápticos ocorre nos animais com EAE tratados com placebo. Escala =50 μ m

Durante o surto da doença houve uma perda sináptica estatisticamente significativa com os animais normais em relação aos animais tratados com placebo e tratados com AG. Também houve uma diferença estatística entre os animais tratados com placebo em relação aos tratados com AG, em que os animais tratados com placebo apresentaram maior perda das conexões sinápticas (normal, $21,40 \pm 0,49$; placebo, $7,06 \pm 0,81$; tratado, $15,37 \pm 0,69$; $p < 0,001$, Figura 5). Observa-se que os neurônios sofreram diversas alterações no

microambiente que levaram à perda sináptica, já o AG foi capaz de reduzir essa modificação e manter a estabilidade sináptica.

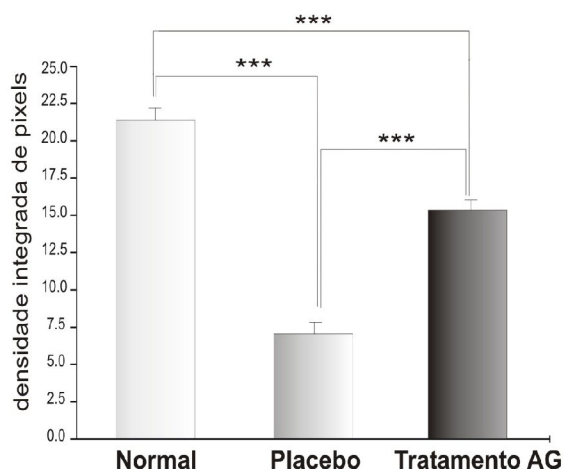


Figura 5: Representação gráfica de densidade integrada de pixels para a imunomarcção anti-sinaptofisina na coluna ventral da medula espinhal de animais normais, doentes tratados com placebo e doentes tratados com AG, durante a fase de **surto** da doença, *** $p < 0.001$, teste t de Student.

Durante a remissão da doença pôde-se perceber, com a melhora dos sinais clínicos, a volta parcial dos movimentos das patas posteriores e as conexões sinápticas foram parcialmente restabelecidas (normal, $21,40 \pm 0,49$; placebo, $11,91 \pm 0,67$ tratado, $16,80 \pm 0,43$; $p < 0,001$, Figura 6). Nota-se que o grupo tratado com AG apresentou similar densidade sináptica em ambas as fases.

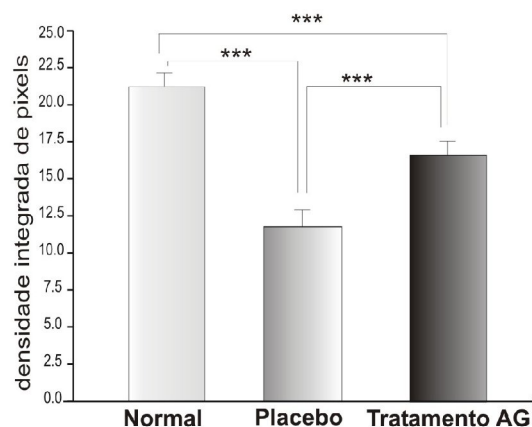


Figura 6: Representação gráfica de densidade integrada de pixels para a imunomarcção anti-sinaptofisina na coluna ventral da medula espinhal de animais normais, doentes tratados com placebo e doentes tratados com AG, durante a fase de **remissão** da doença, *** $p < 0.001$, teste t de Student.

5.1.3 Diminuição da astrogliose reativa em animais tratados com AG

Os astrócitos, quando reativos, expressam maior quantidade de uma proteína do citoesqueleto denominado GFAP, que é expressa por astrócitos e outras células do SNC. Em uma situação de desequilíbrio no SNC, como a causada pelas alterações induzidas pela doença, há um aumento significativo da quantidade dessas proteínas especialmente durante o surto.

A figura 7 mostra a expressão de GFAP durante o surto e a remissão da doença. As setas indicam os motoneurônios medulares. Nas Figuras 7 A e D estão representados os animais controle, Figuras 7 B e E animais doentes tratados com placebo e Figuras 7 C e 7 F tratado com AG, e nota-se que durante o surto, a expressão de GFAP é elevada nos animais tratados com placebo. Já nos animais tratados com AG, uma menor expressão de GFAP é observada.

Durante a fase de remissão observa-se uma redução da expressão dessa proteína nos animais tratados com placebo e também nos animais tratados com AG.

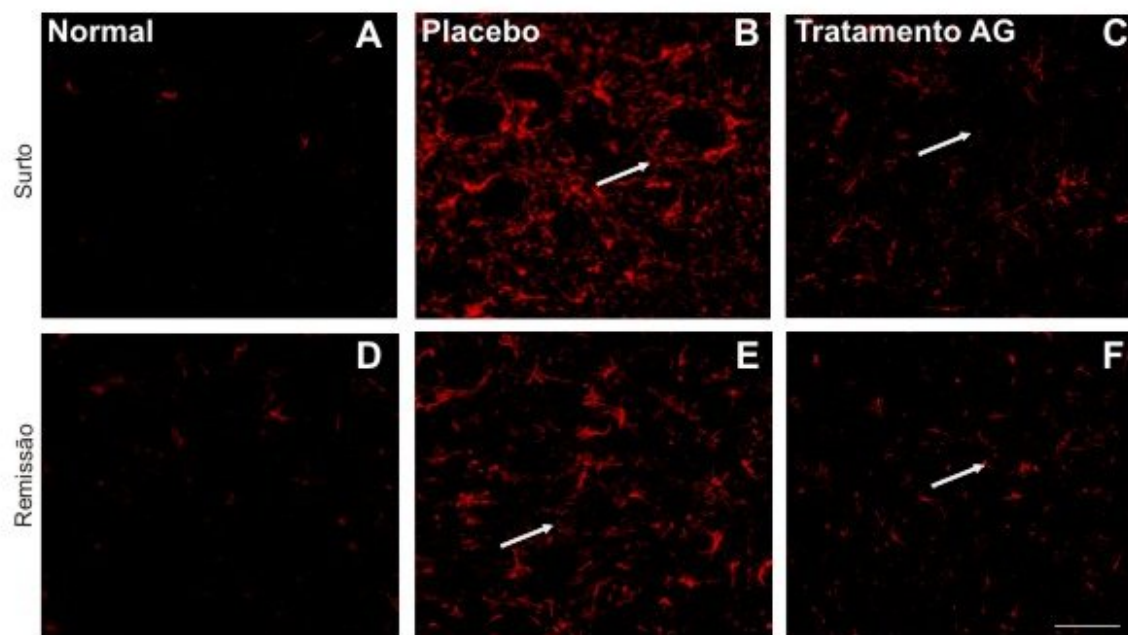


Figura 7: Imunomarcacão anti-GFAP na coluna ventral da medula espinhal de animais com EAE nas fases de Surto (**A a C**) e Remissão da doença (**D a F**). **A-D** animais normais, sem a doença, **B-E** animais doentes tratados com placebo e **C-F** animais doentes tratados com AG, respectivamente. Note redução da expressão de GFAP nos animais tratados e na fase de remissão. Escala =50 μ m.

Um aumento significativo na atividade dos astrócitos durante o surto da doença foi demonstrado pela presença de astrogliose reativa na medula espinhal. Esse aumento de GFAP nas adjacências dos neurônios demonstra uma comunicação neurônio/glia durante o surto da doença. A administração de AG reduziu parcialmente a expressão de GFAP durante o surto (normal, $4,83 \pm 0,49$; placebo, $13,14 \pm 1,32$; tratado, $5,57 \pm 0,97$; $p < 0,01$, Figura 8).

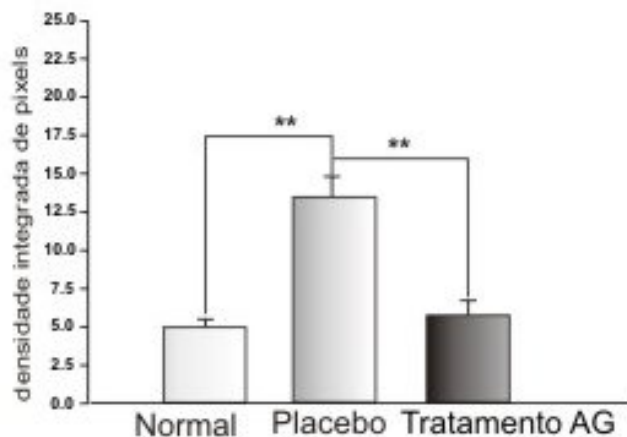


Figura 8: Representação gráfica de densidade integrada de pixels para a imunomarcção anti-GFAP na coluna ventral da medula espinhal de animais normais, doentes tratados com placebo e doentes tratados com AG, durante a fase de **surto** da doença, $**p < 0.01$, teste de Mann Whitney.

Durante a fase de remissão da doença, os animais tratados com placebo apresentaram uma redução da expressão de GFAP, indicando a diminuição da reatividade local. Os animais tratados com AG apresentaram um discreto aumento na expressão de GFAP, porém em níveis abaixo dos expressos pelo placebo (normal, $4,83 \pm 0,49$; placebo, $9,78 \pm 0,77$; tratado, $7,21 \pm 0,37$; $p < 0,05$, Figura 9).

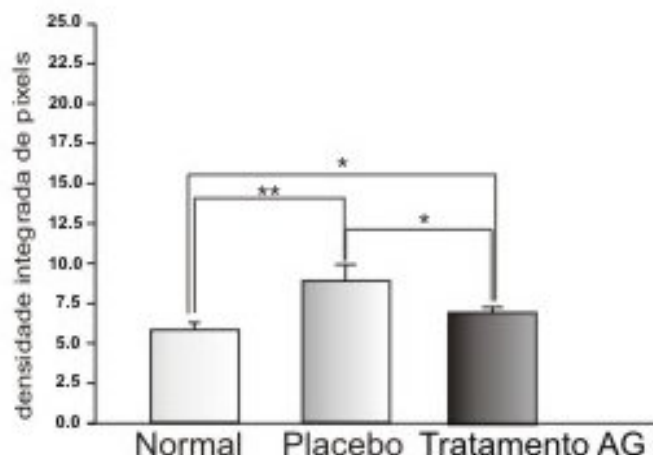


Figura 9: Representação gráfica de densidade integrada de pixels para a imunomarcção anti-GFAP na coluna ventral da medula espinhal de animais normais, doentes tratados com placebo e doentes tratados com AG, durante a fase de **remissão** da doença, * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ teste t de Student.

5.1.4 Diminuição da reatividade da microglia em animais tratados com AG

A microglia apresenta um aumento no SNC quando há uma lesão, nesta situação essas células são chamadas de reativas. A imunomarcção anti-iba1 representa a intensidade da reatividade da microglia, representada na figura 10. As Figuras 10 A e 10 D mostram os animais controle, as Figuras 10 B e 10 E mostram os animais doentes tratados com placebo, durante o surto e remissão. Já as Figuras 10 C e 10 F mostram os animais doentes tratados com AG, durante o surto e remissão respectivamente.

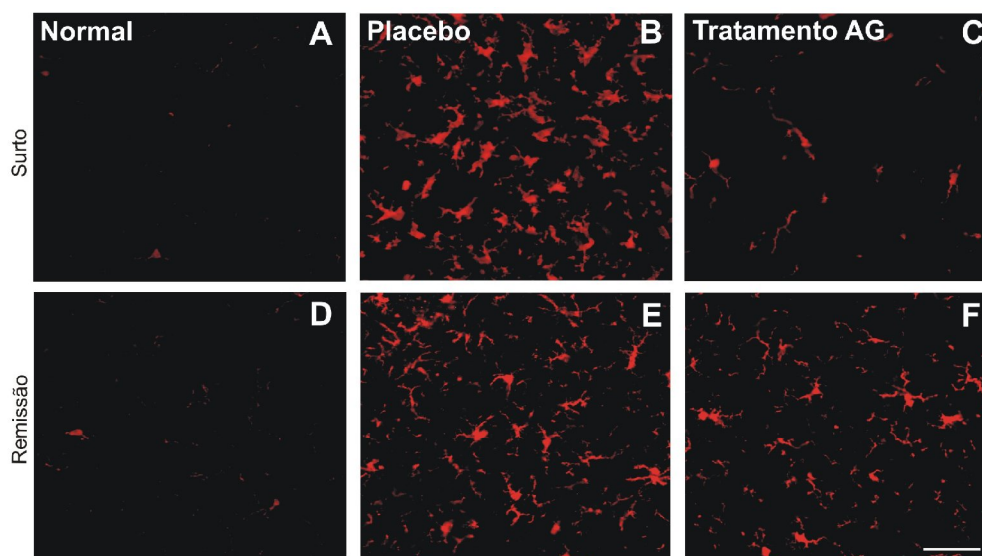


Figura 10: Imunomarcção anti-Iba1 na coluna ventral da medula espinhal de animais com EAE nas fases de Surto (**A a C**) e Remissão da doença (**D a F**). **A-D** animais normais, sem a doença, **B-E** animais doentes tratados com placebo e **C-F** animais doentes tratados com AG, respectivamente. Note redução da expressão de Iba1 nos animais tratados e na fase de remissão. Escala =50 μ m.

Durante o surto da EAE, o AG foi capaz de diminuir a reatividade da microglia, comparativamente ao grupo placebo (normal $3,58 \pm 0,24$; placebo, $19,54 \pm 0,97$; tratado, $6,88 \pm 1,15$; $p < 0,01$, Figura 11).

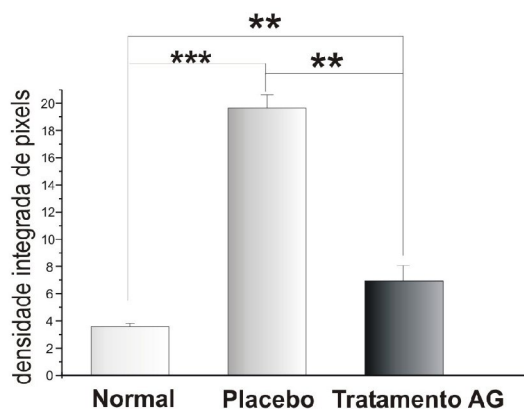


Figura 11: Representação gráfica de densidade integrada de pixels para a imunomarcção anti-iba1 na coluna ventral da medula espinhal de animais normais, doentes tratados com placebo e doentes tratados com AG, durante a fase de **surto** da doença, **p< 0.01 e *** p< 0.001, teste de Mann whitney.

A fase de remissão apresentou uma diminuição da expressão de iba1 em ambos os grupos induzidos à EAE (normal, 3,58 ± 0,24; placebo, 8,44± 0,39; tratado, 6,58 ± 0,30; p<0,05, Figura 13).

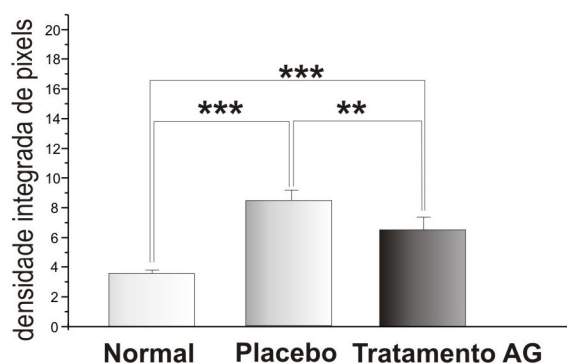


Figura 12: Representação gráfica de densidade integrada de pixels para a imunomarcção anti-iba1 na coluna ventral da medula espinhal de animais normais, doentes tratados com placebo e doentes tratados com AG, durante a fase de **remissão** da doença, **p< 0.01 e *** p< 0.001, teste t de Student.

5.1.5 Aumento das proteínas MHC I, Sinaptofisina e GFAP nos animais submetidos a EAE

A quantidade de proteína expressa no tecido nervoso medular foi mensurada por *Western blotting* para as proteínas MHC I, Sinaptofisina e GFAP, em animais normais, animais induzidos à EAE e tratados com AG e tratados com placebo, durante o surto e remissão da doença.

A figura 13 mostra a expressão de MHC I, nos animais normais, tratados com AG e placebo. A Figura 13 A mostra a expressão de MHC I durante a fase de surto e a Figura 13 B mostra a expressão durante a fase de remissão. Observa-se que a expressão de MHC I está aumentada em ambas as fases da doença, revelando uma diferença estatística entre os grupos (normal, $0,47 \pm 0,07$; tratado, $0,93 \pm 0,17$; placebo, $2,76 \pm 0,26$; $p < 0,001$; gráfico C). Nota-se que na fase de remissão, a expressão de MHC I diminui nos animais doentes, especialmente nos tratados com AG, pois chegam quase a mesma quantidade de proteína expressa pelos animais normais, revelando uma diferença estatística entre eles (normal, $0,89 \pm 0,15$; tratado, $0,95 \pm 0,11$; placebo, $1,60 \pm 0,08$; $p < 0,001$; gráfico D).

MHC I

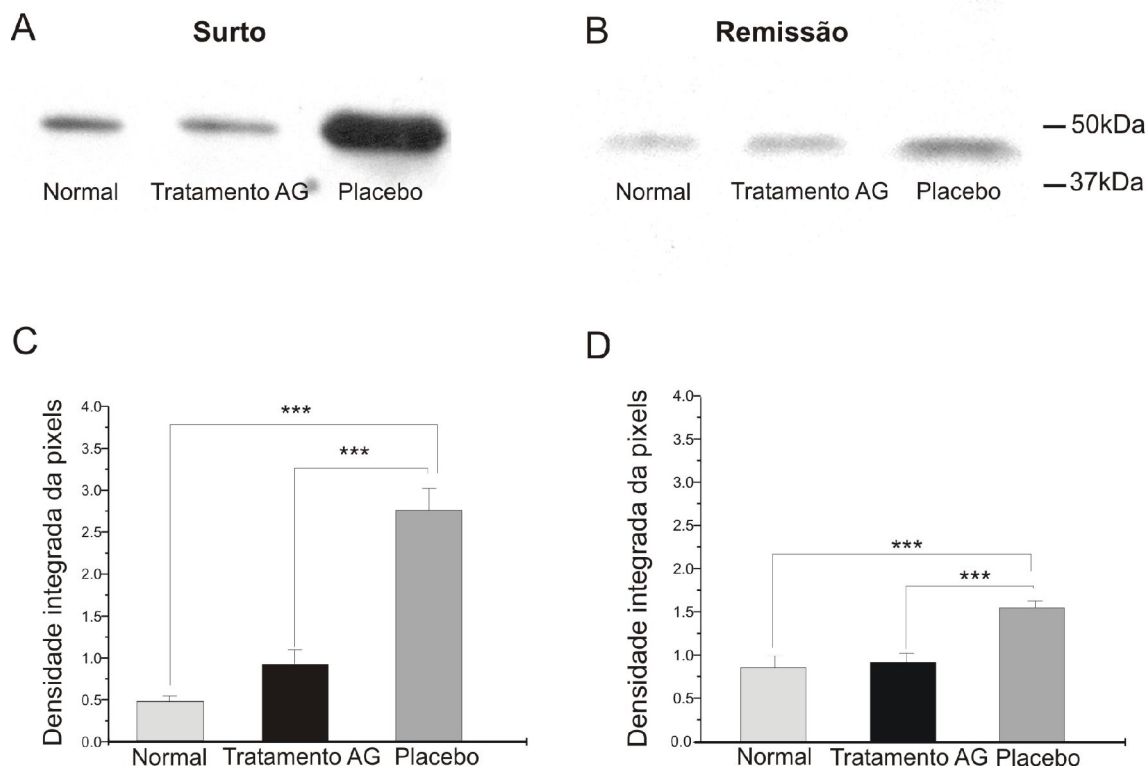


Figura 13: Expressão da proteína MHC classe I (44 KDa) na intumescência lombar por Western blotting, em animais normais, induzidos à EAE e tratados AG e com placebo. Observe o aumento da expressão dessa proteína nos animais tratados com placebo principalmente durante o surto da doença. Já o tratamento AG foi capaz de reduzir a expressão de MHC I. Os gráficos C e D mostram a quantificação em densidade integrada de pixels e a comparação entre os grupos, durante as fases de surto e remissão da doença, respectivamente, *** $p < 0.001$ e *** $p < 0.001$, teste de Mann Whitney.

A proteína expressa pelos astrócitos reativos, GFAP, mostrou também estar aumentada nos animais induzidos à EAE em relação aos animais normais. Porém, os animais tratados com AG mostraram menor expressão dessa molécula comparativamente com os animais tratados com placebo, como mostra a figura 14. Durante o surto houve uma diferença estatística entre os animais submetidos à

EAE e tratados com placebo, em relação aos animais normais e tratados com AG (normal, $8,17 \pm 0,84$; tratado, $8,35 \pm 0,57$; placebo, $11,60 \pm 0,70$; $p < 0,05$; gráfico C). O mesmo ocorreu na fase de remissão, já que o placebo ainda expressou maior quantidade de GFAP (normal, $7,53 \pm 0,51$; tratado, $8,01 \pm 0,53$; placebo, $9,89 \pm 0,24$; $p < 0,001$; gráfico D).

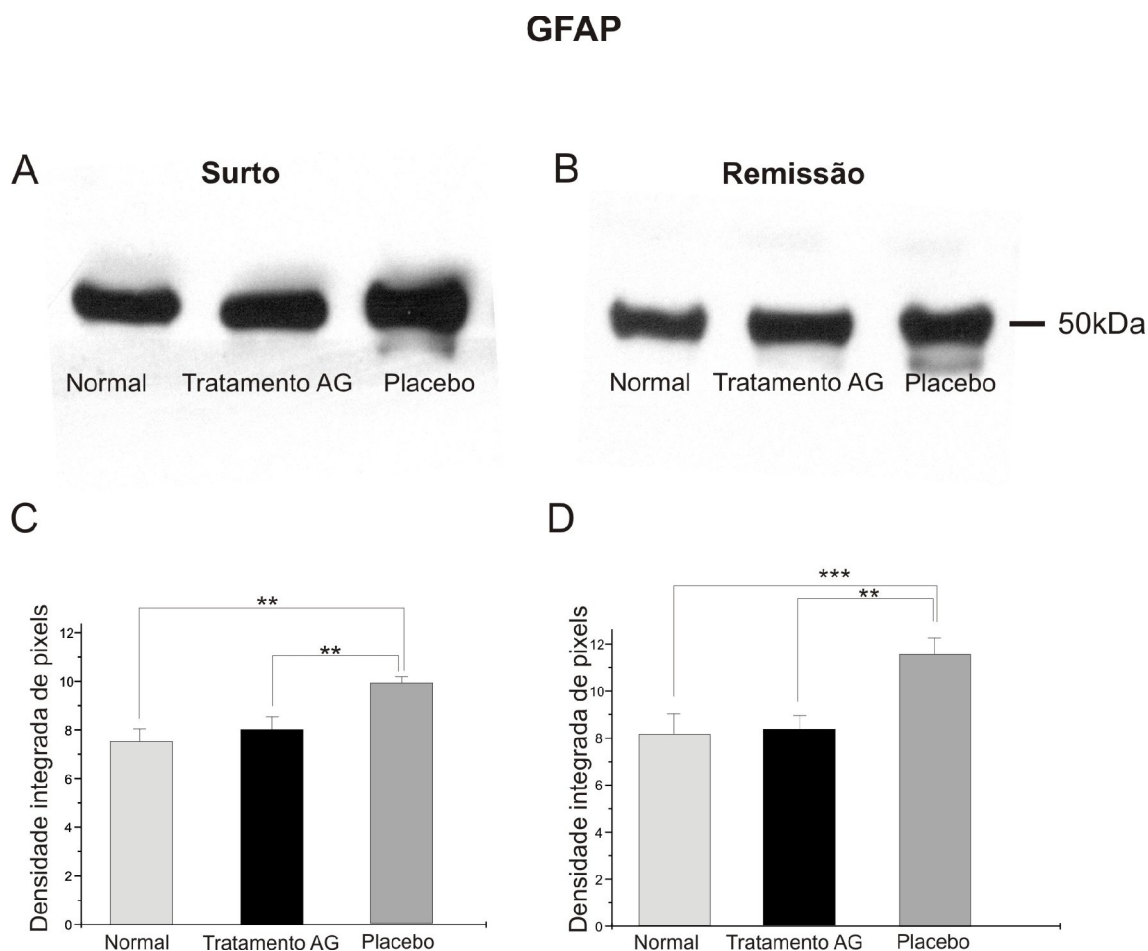


Figura 14: Expressão da proteína GFAP (50 KDa) na intumescência lombar por Western blotting em animais normais, induzidos à EAE e tratados com AG e placebo. Observe o aumento da expressão dessa proteína nos animais tratados com placebo em ambas as fases da doença. O AG foi capaz de inibir parcialmente a expressão de GFAP. Os gráficos C e D mostram a quantificação, em densidade integrada de pixels e a comparação entre os grupos, durante as fases de surto e remissão da doença, respectivamente, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$, teste t de Student.

A expressão de sinaptofisina apresentou-se diminuída nos animais doentes, demonstrando a ocorrência de uma lesão neuronal e rearranjo sináptico (Figura 15). Os animais tratados com AG, em ambas as fases, apresentaram melhor preservação da cobertura sináptica em relação aos tratados com placebo. O gráfico C mostra a diferença estatística entre os grupos durante a fase de surto da doença (normal, $12,96 \pm 0,66$; tratado, $11,94 \pm 0,88$; placebo, $8,68 \pm 1,10$; $p < 0,01$). Já o gráfico D mostra a diferença entre os grupos, na fase de remissão (normal, $18,24 \pm 0,56$; tratado, $15,76 \pm 0,78$; placebo, $13,33 \pm 0,68$; $p < 0,001$).

Sinaptofisina

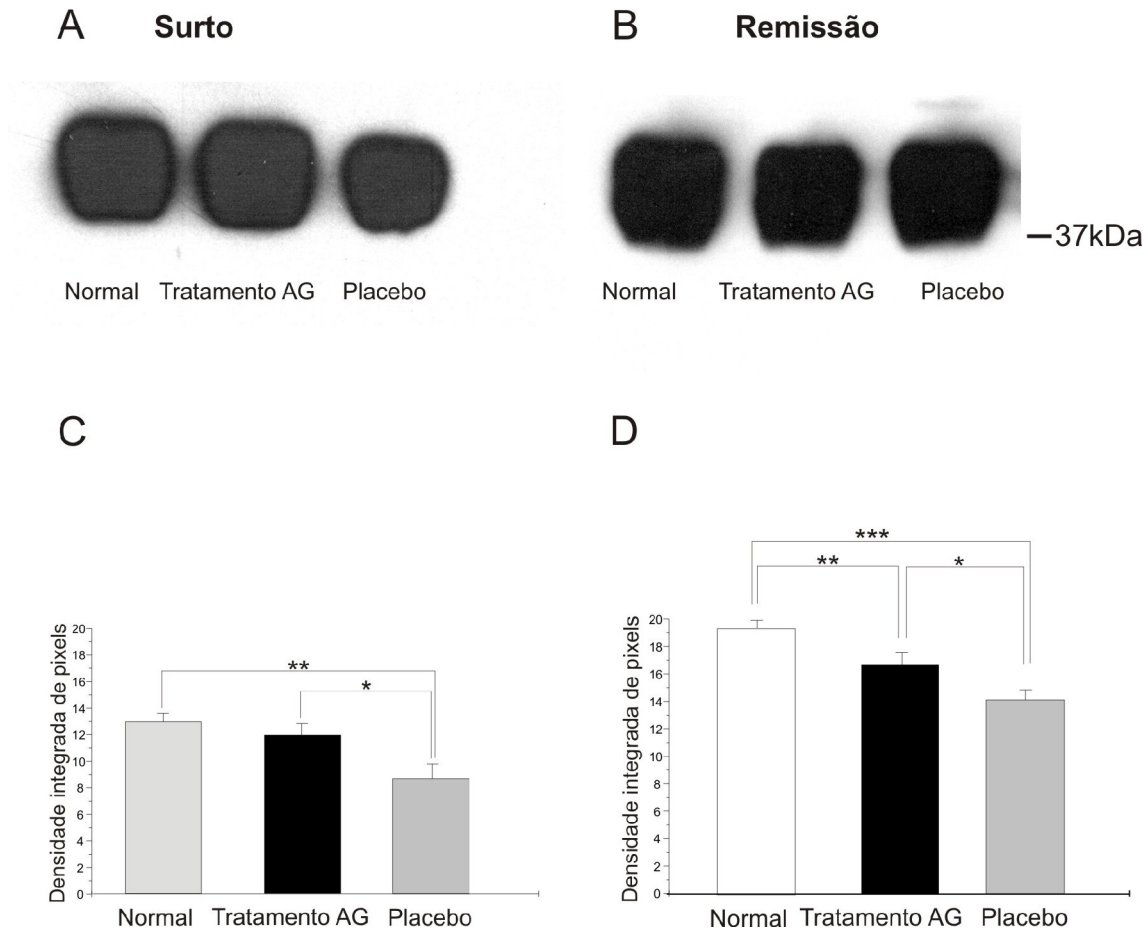


Figura 15: Expressão da proteína Sinaptofisina (38 KDa) na intumescência por Western blotting em animais normais, induzidos à EAE e tratados com AG e placebo. Observe a diminuição da expressão dessa proteína nos animais doentes, já o AG é capaz de inibir as perdas sinápticas. Os gráficos C e D mostram a quantificação em densidade integrada de pixels e a comparação entre os grupos, durante as fases de surto e remissão da doença, respectivamente, * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$, teste t de Student.

5.1.6 Alterações ultraestruturais na medula espinhal após a EAE e tratamento com AG

A EAE causa perdas sinápticas e gera destacamento de grande quantidade de botões sinápticos dos neurônios lesionados. Observa-se na Figura 16 imagens de motoneurônios alfa da coluna ventral da medula espinhal e seus botões sinápticos, nas Figuras 16 A e 16 B observa-se os neurônios dos animais com EAE tratados com placebo, já na Figura 16 C e 16 D os neurônios de animais com EAE tratados com AG.

As figuras mostram que os animais tratados com placebo apresentam maior perda sináptica em relação aos tratados com AG, mostrando que o AG tem a capacidade de manter a estabilidade sináptica e proporcionar diminuição dos sinais clínicos da doença nos animais doentes.

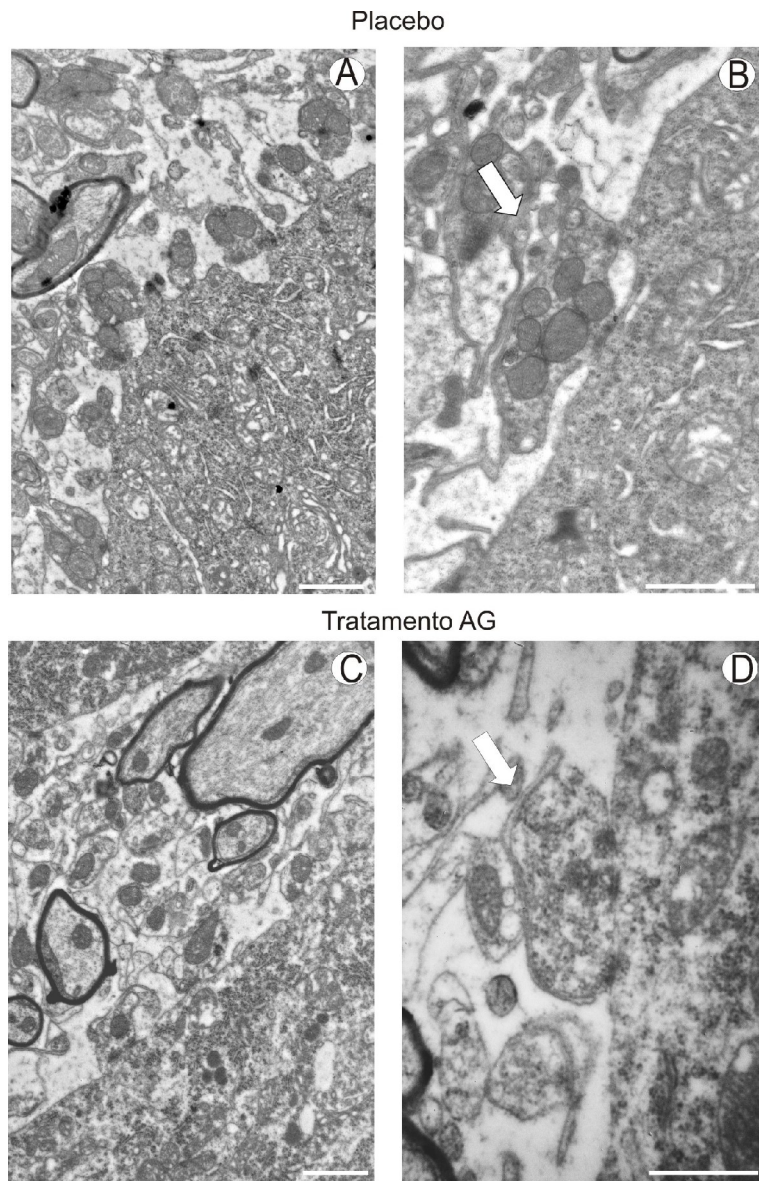


Figura 16: Representação dos botões sinápticos em aposição ao corpo dos motoneurônios medulares da coluna ventral da medula espinhal de animais no surto da EAE. Figura 16 **A-B** mostra os animais tratados com placebo e na Figura 16 **C-D** os animais tratados com AG. Nota-se maior aposição dos botões sinápticos com o corpo dos neurônios nos animais tratados com AG. Escala = 50 μ m.

5.2 Efeitos do tratamento com AG na plasticidade sináptica após AV da raiz motora

5.2.1 Influência do AG na sobrevivência neuronal após AV

Para comprovação sobre a ação neuroprotetora do AG no SNC, foi realizada a contagem do número de motoneurônios presentes no núcleo motor dorsolateral na lamina IX na medula espinal, duas semanas após a lesão mecânica da avulsão. A Figura 17 mostra a porcentagem de sobrevivência neuronal duas semanas após a avulsão nos animais tratados com AG ou tratados com solução placebo. A Figura 17 A apresenta neurônios motores normais, Figura 17 B neurônios de animais tratados com AG e Figura 17 C neurônios de animais tratados com placebo.

A ação neuroprotetora do AG pode ser observada ($p < 0,05$), mostrando que houve um aumento de 40% na sobrevivência neuronal dos animais tratados com AG (placebo, $39.07\% \pm 2.31$; tratamento AG, $67.42\% \pm 10$; média da razão ipsilateral/contralateral $\pm$ SD).

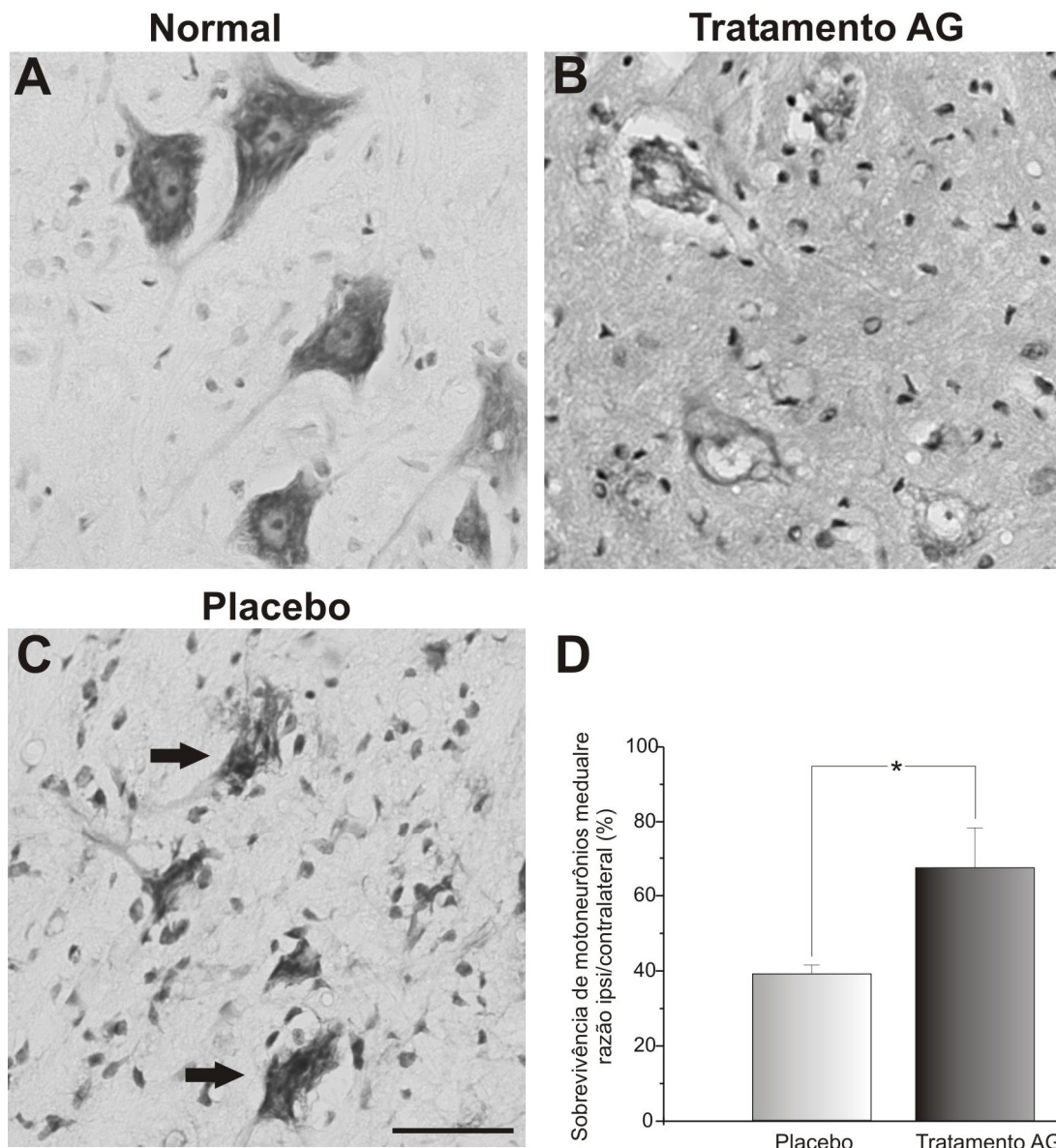


Figura 17: Representação de corpos celulares do núcleo motor do nervo isquiático, mostrando na Figura A os motoneurônios medulares não lesados. Na figura B os motoneurônios de animais tratados com AG e na Figura C motoneurônios de animais tratados com placebo. A seta indica a cromatólise de um motoneurônio em que ocorre redução do diâmetro do corpo células após o tratamento com placebo. Na figura D há a porcentagem de sobrevivência de motoneurônios medulares após a AV e tratamento com placebo ou AG. Barra de escala = 50µm, * $p < 0.05$, teste t de Student.

5.2.2 Imunomarcção de Sinaptofisina, GFAP e Iba-1 após AV e tratamento com a AG

Para observação das alterações na atividade sináptica após a AV e o tratamento com GA foram realizadas imunomarcações no núcleo motor da medula espinhal dos animais avulsionados placebo e tratados com AG. Foi observada a preservação sináptica pela imunomarcção de sinaptofisina, reatividade astrocitária pela expressão de GFAP e reatividade microglial pela imunomarcção de Iba1.

A imunomarcção de sinaptofisina, Figura 18 demonstra que com o tratamento com AG há a preservação de terminais nervosos, especialmente ao redor dos motoneurônios lesionados. A Figura 18 A-B mostra os motoneurônios do núcleo motor do nervo isquiático dos animais tratados com placebo, lado contra-lateral à lesão (A) e Ipsilateral à lesão (B), já a Figura 18 C-D mostra os animais tratados com AG, contra-lateral à lesão (C) e Ipsilateral à lesão (D), onde se observa uma diferença estatística $p < 0,05$ (placebo, $0,58 \pm 0,04$; tratamento AG, $0,73 \pm 0,08$; média da razão ipsilateral/contralateral $\pm$ SD).

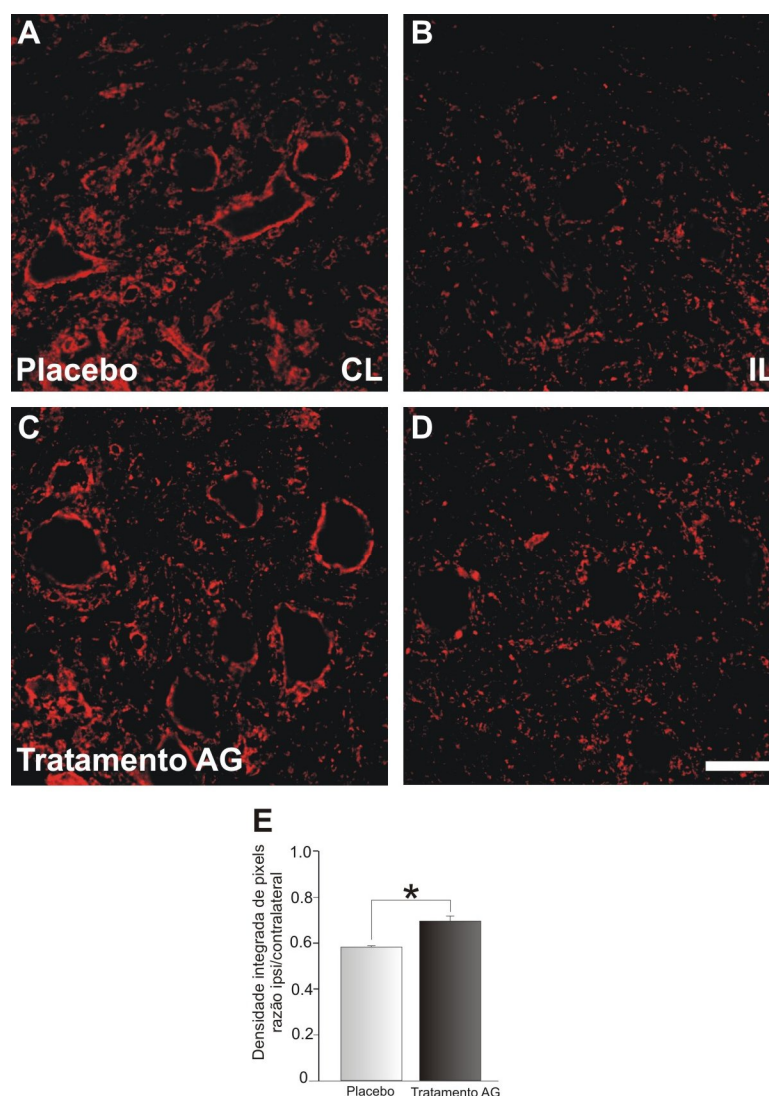


Figura 18: Imunomarcção de sinaptofisina em motoneurônios medulares de animais avulsionados divididos em grupo placebo e tratado. **A-C** mostra o lado contralateral à lesão e **B-D** o lado ipsilateral à lesão dos animais placebo e tratado com AG, respectivamente. Barra de escala =50 μ m, * $p < 0.05$, teste t de Student.

A expressão de GFAP pelos astrócitos foi também observada nos animais avulsionados. Sabe-se que com a lesão há uma intensa hipertrofia astrocitária e aumento da expressão de GFAP. O tratamento com AG se mostrou eficaz para diminuição parcial da expressão de GFAP neste tipo de lesão, como mostra a Figura 19. Na Figura 19 A-B observa-se os motoneurônios do núcleo motor do

nervo isquiático nos animais tratados com placebo e na Figura 19 C-D os motoneurônios dos animais tratados com AG (placebo, $2,21 \pm 0,19$; tratamento AG, $1,62 \pm 0,16$; média da razão ipsilateral/contralateral $\pm$ SD; $p, 0,05$).

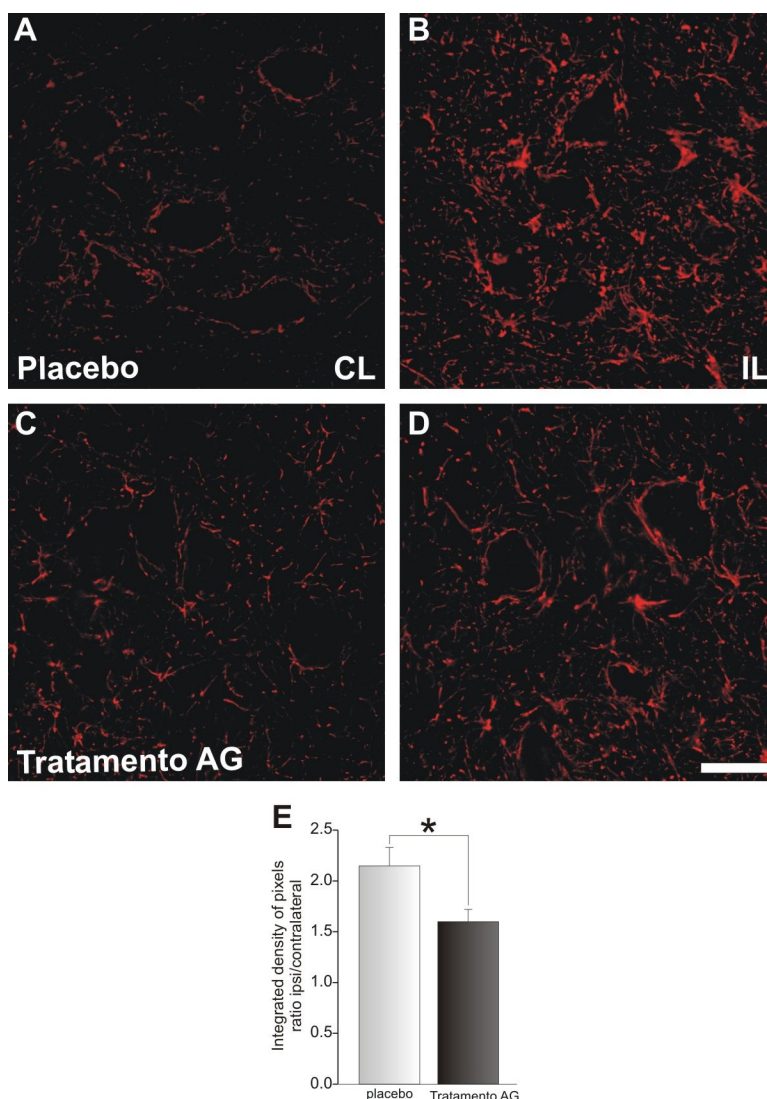


Figura 19: Imunomarcção de GFAP em motoneurônios medulares de animais avulsionados divididos em grupo placebo e tratado. **A-C** mostra o lado contralateral à lesão e **B-D** o lado ipsilateral à lesão dos animais placebo e tratado com AG, respectivamente. Barra de escala =50 μ m, * $p < 0.05$, teste t de Student.

A microglia apresenta-se reativa após lesões no SNC, ocorrendo também na avulsão das raízes nervosas, para esta avaliação foi realizada uma

imunomarcacão com Iba-1, mostrada na Figura 20. Nota-se na Figura 20 A-B a reatividade microglial dos motoneurônios no núcleo motor do nervo isquiático do lado contralateral e ipsilateral à lesão. O tratamento com AG foi capaz de reduzir a atividade microglial, mostrado na Figura 20 C-D, em que nota-se a diferença estatística $p < 0,05$ em (D) lado ipsilateral à lesão (placebo, $3,32 \pm 0,25$; tratamento AG, $1,89 \pm 0,10$; média da razão ipsilateral/contralateral $\pm$ SD).

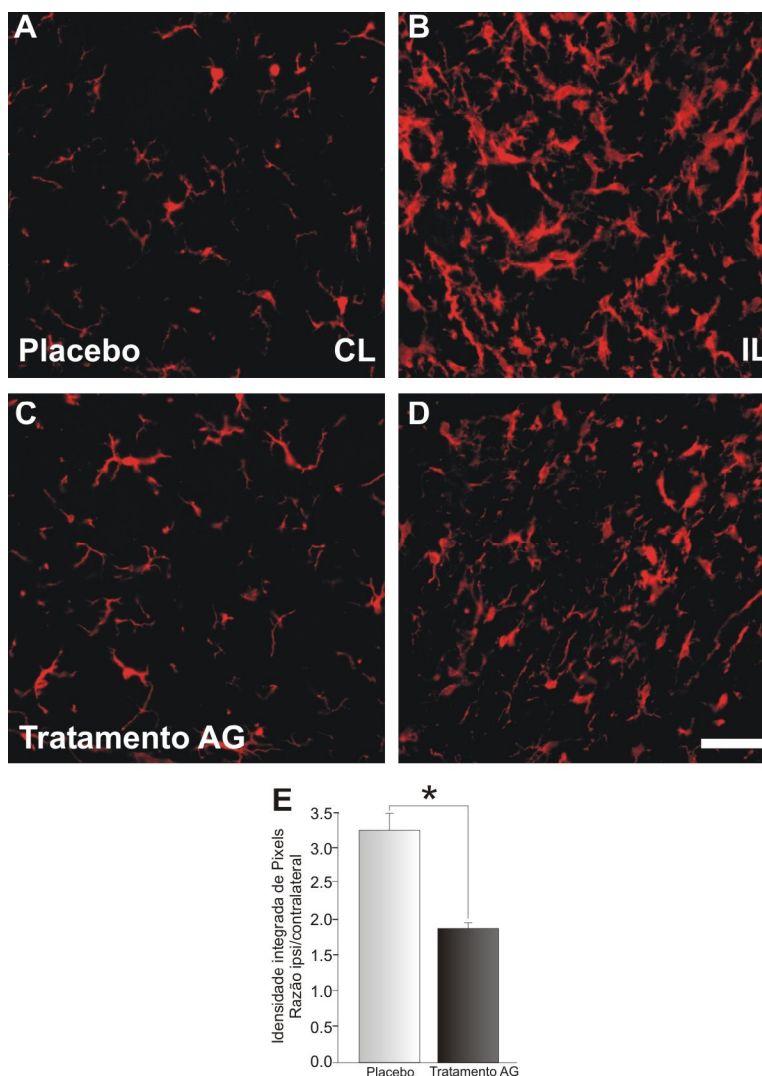


Figura 20: Imunomarcacão de Iba-1 em motoneurônios medulares de animais avulsionados divididos em grupo placebo e tratado. **A-C** mostra o lado contralateral à lesão e **B-D** o lado ipsilateral à lesão dos animais placebo e tratado com AG, respectivamente. Barra de escala = 50 μ m, * $p < 0.05$, teste t de Student.

6. Discussão

6.1 Modelo animal da EAE

A EAE tem sido utilizada há muitos anos como um modelo experimental da EM. Os animais apresentam lesões desmielinizantes, inflamação perivascular do SNC e alterações imunológicas. O aprofundamento de estudos relacionados à indução de camundongos, ratos, mamíferos à EAE e a escolha mais adequada dos antígenos utilizados para cada um dos animais tem sido bastante estudada atualmente, pois ainda há algumas imperfeições no modelo (7, 11, 68, 79). Uma das maiores limitações encontradas nos modelos animais está em determinar os fatores que iniciam a patogênese da doença, uma vez que é induzida de forma artificial. Além disso, alguns animais como os ratos, apresentam uma manifestação clínica monofásica, ou seja, há um surto da doença e alguns dias depois completa recuperação clínica. Alguns modelos da EAE têm desenvolvido lesões no SNC mais próximas da EM em humanos, como a EAE nos animais C57BL/6 induzida com MOG₃₅₋₅₅ ou nos camundongos Biozzi AB/H, pois ambos apresentam um processo de desmielinização mais severos e com características desmielinizantes crônicas e próximas ao dos humanos, não observados em outras linhagens. Portanto, para este estudo foi escolhida a indução da EAE em camundongos C57BL/6 para melhor observação das características clínicas da EM perante o tratamento com AG.

6.2 Tratamento com AG após EAE e avulsão das raízes motoras

O AG é um medicamento imunomodulador, já utilizado em pacientes com EM, porém nem todos os mecanismos de ação desta droga estão bem estabelecidos.

Sabe-se que um dos efeitos terapêuticos atribuídos ao AG é a indução de células do tipo Th2, as quais produzem citocinas anti-inflamatórias que induzem uma diminuição das respostas a outros componentes encefalitogênicos, como os peptídeos proteolipídicos (38). Outro fator importante mostra que a administração dessa droga promove uma redução da produção de óxido nítrico e redução dos sinais clínicos em camundongos com EAE (44).

Foi observado neste estudo que além das funções imunomoduladoras já descritas na literatura o AG apresenta funções para manutenção da estabilidade sináptica dos neurônios motores na medula espinhal e também inibe a expressão excessiva de MHC I na EAE, ajudando na diminuição dos sinais clínicos. Foi demonstrado, adicionalmente, que o tratamento com AG estimula as células mononucleares do sangue a expressarem um potente fator neurotrófico, o BDNF (43). Este fator neurotrófico, em estudo recente, se mostrou como um importante fator para o aumento da sobrevivência de motoneurônios avulsionados (80). Interessantemente, o AG mostrou que além de ser uma droga imunomoduladora, como já descrita na literatura, também apresenta um papel neuroprotetor após uma lesão mecânica de raízes nervosas, como a avulsão.

6.3 Diminuição da expressão de MHC I no tratamento com AG na EAE

O MHC I apresenta funções no sistema imunológico muito bem estabelecidas, apresentando peptídeos para serem reconhecidos pelas células T. Essas moléculas são altamente polimórficas e fundamentais para a manutenção da imunidade gerada pelas células T (5).

Há alguns anos atrás não se acreditava que o SNC era capaz de expressar moléculas de MHC I, já que era considerado um sistema imunoprivilegiado. Porém, estudos de aproximadamente 10 anos atrás, trouxeram evidências que o SNC é capaz de expressar essas moléculas (81, 82). Em 2000, Huh e colaboradores (34) mostraram que a ausência do MHC I trazia prejuízos para o desenvolvimento do tecido nervoso e, portanto, foi investigado o refinamento sináptico durante o desenvolvimento visual de animais que não expressavam MHC I. Notou-se que haviam sinapses extra-numerarias nesses animais, mostrando que o MHC I apresentava uma função diferenciada e específica no SNC, sendo importante para a eliminação ou refinamento sináptico durante o desenvolvimento.

Investigando a importância dessa molécula na plasticidade sináptica do SNC, Oliveira et al. (32) analisaram a preservação dos botões sinápticos após transsecção do nervo isquiático de camundongos e concluíram que o MHC I apresenta uma resposta direta sobre as lesões nervosas, sendo fundamental para a manutenção seletiva dos terminais inibitórios em aposição aos neurônios axotomizados. Na ausência da expressão de MHC I, nos animais knockout para β 2-microglobulina, notou-se uma retração exacerbada dos botões pré-sinápticos inibitórios e excitatórios.

O MHC I parece ser importante para a manutenção das conexões sinápticas e também para a comunicação entre neurônios e células gliais, alguns estudos têm mostrado isso recentemente (32, 82). O trabalho de Zanon e Oliveira (83) investigou a reatividade astrocitária e plasticidade sináptica da medula de animais com axotomia do nervo isquiático tratados com interferon beta. Essa molécula

influenciou na expressão de MHC I e, portanto os animais tratados com ela apresentaram maior expressão de MHC I, diminuição da imunoreatividade para sinaptofisina e intensificação da atividade astrocitária. Deste modo, mostrou-se que a intensidade da expressão de moléculas de MHC I influencia as respostas frente a lesões do tecido nervoso por trauma ou doença.

Outro trabalho desenvolvido em 2008 por Sabha et al (35) mostrou que os animais da linhagem A/J expressavam maiores níveis de MHC I e apresentavam uma capacidade regenerativa maior, assim como uma maior taxa de retração das sinapses após a axotomia do nervo isquiático. Já os animais C57BL/6, que expressavam menores níveis de MHC I, apresentavam baixo potencial regenerativo e menor porcentagem de destacamento sináptico.

Neste trabalho foi realizada a investigação da expressão de MHC I na medula espinhal dos camundongos com EAE tratados com AG. Os resultados obtidos mostram que o AG também regula a expressão de MHC I que afeta o microambiente medular e colabora para a diminuição da proliferação microglial, astrocitária e perdas sinápticas. As lesões causadas pela EAE são diferentes da axotomia periférica, pois há quebra da barreira hemato-encefálica e uma complexidade patológica maior, onde há também alterações imunológicas muito importantes ocorrendo simultaneamente.

Os resultados obtidos mostram que provavelmente a expressão do MHC I seja muito importante para a manutenção sináptica, mas o excesso dele no SNC seja prejudicial no caso da EAE, pois colabora para maior destacamento dos inputs neuronais, ocasionando perdas sinápticas e resultando em uma evolução dos sinais clínicos da doença. O AG mostrou-se eficaz também para a manutenção

dos níveis mais próximos ao basal na expressão de MHC I, o que proporciona menores perdas sinápticas e melhora funcional do quadro clínico dos camundongos.

A complexa função do MHC I no SNC ainda não foi totalmente desvendada, sabe-se que é importante para a manutenção sináptica, porém lesões periféricas e doenças autoimune reagem diferentemente à expressão dessa molécula, já que os mecanismos envolvidos em cada uma das lesões são distintos.

O estudo do MHC I nos animais tratados com AG foi importante também para mostrar uma nova ação desse medicamento sobre SNC, nunca descrita anteriormente, demonstrando que ele também atua na manutenção das sinapses e, portanto, auxilia na diminuição dos sinais clínicos.

6.4 Influência do tratamento com AG na preservação sináptica, astrogliose reativa e reatividade microglial após EAE

Reação astrocitária e microglial, assim como retração de terminais nervosos em aposição a motoneurônios são observadas durante o surto da EAE. Segundo estudo de Marques et al (74), durante o surto da EAE a imunomarcagem anti-sinaptofisina apresentam-se reduzida, já durante a recuperação ou a remissão da doença, essa imunorreatividade aparece parcialmente recuperada.

Por outro lado, durante a EAE, os monócitos e macrófagos colaboram com o processo de apresentação de antígenos pelos linfócitos T CD4+. Mesmo na fase de remissão da doença, a microglia apresenta-se com níveis acima do normal, sugerindo que células CD4+ ainda estejam ativas respondendo às alterações causadas pela resposta imunológica (84). A microglia não atua somente como

apresentadora de antígenos, pois quando ela encontra-se reativa e em excesso, como no caso da EAE, causa danos a outras células do SNC. Uma explicação para esse fato é a liberação de glutamato, promovendo neurotoxicidade, podendo contribuir para uma neurodegeneração na EM. O AG parece contribuir diminuindo o grau de reatividade de microglia em relação aos animais tratados com placebo, podendo sugerir que uma menor atividade dessas células durante a doença seja relevante para a manutenção da integridade do SNC (85).

Pode-se observar nos resultados dos terminais pré-sinápticos por imunistoquímica (anti-sinaptofisina) e por MET que o tratamento com AG auxilia na manutenção da integridade sináptica, principalmente durante o surto, pois os danos sinápticos são maiores quando os animais apresentam piores sinais clínicos. Os resultados obtidos analisando-se a astrogliose reativa (GFAP) e reatividade microglial (iba1) mostraram uma diminuição de ambos com o tratamento com AG, tanto no surto quanto na fase de remissão da doença, sendo importantes para diminuição dos sinais clínicos.

6.5 Influência do tratamento com AG na preservação sináptica, astrogliose reativa e reatividade microglial após avulsão das raízes motoras

A redução da reação glial ao redor do motoneurônio alfa após AV tem sido previamente descrita como um fator que influencia a formação da sinapses *in vitro* e *in vivo* (86). Em lesões proximais da medula espinhal também é possível observar grandes perdas neurais, ocasionando perdas permanentes das funções motoras e sensitivas (32, 70). Para o estudo dessas lesões que geram degeneração neural pode-se realizar a AV das raízes ventrais na medula espinhal,

pois causam uma perda de motoneurônios medulares. No trabalho de Hell et al (80) observa-se que os animais avulsionados, sem nenhum tratamento ou apenas tratados com PBS apresentaram uma grande perda sináptica, morte neuronal e aumento da astrogliose reativa.

O tratamento com AG nos animais submetidos à AV das raízes ventrais mostra que uma influência na estabilidade sináptica dos circuitos da medula espinhal, que são perturbados após a AV. A análise da Imunoistoquímica mostrou que o tratamento com AG proporcionou uma preservação da imunomarcagem de sinaptofisina na medula espinhal, já o tratamento com placebo resultou numa grande redução dessa imunomarcagem. As imunomarcações para astrogliose apresentaram-se diminuídas nos animais tratados com GA, tendo-se em vista que esta droga é anti-inflamatória.

O novo papel neuroprotetor para o AG pode ser importante para o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento de lesões na medula espinhal, uma vez que a combinação de drogas capazes agirem diretamente na reação de elementos gliais e aumentar a estabilidade de certos circuitos neurais são fundamentais para a recuperação funcional subsequente.

7. Conclusões

Os resultados obtidos nesse trabalho demonstram que o AG auxilia na manutenção das sinapses e sobrevivência neuronal na avulsão do SNC e também influência nos níveis de expressão de MHC. Portanto conclui-se que:

- A diminuição da expressão de MHC I ocasionada pelo tratamento com AG na EAE mostrou influenciar a estabilidade sináptica de motoneurônios afetados pela EAE.
- A astrogliose reativa e a reatividade microglial apresentaram-se diminuídas no tratamento com AG, coincidindo com baixos níveis de MHC I.
- Na avulsão das raízes motoras houve menor morte neuronal nos animais tratados com AG, mostrando maior preservação dos circuitos medulares .

8. Referências bibliográficas

1. Hickey WF. The pathology of multiple sclerosis: a historical perspective. *J Neuroimmunol*. 1999 Jul 1;98(1):37-44.
2. Achiron A, Gurevich M. Peripheral blood gene expression signature mirrors central nervous system disease: the model of multiple sclerosis. *Autoimmun Rev*. 2006 Oct;5(8):517-22.
3. Coles A, Deans J, Compston A. Campath-1H treatment of multiple sclerosis: lessons from the bedside for the bench. *Clin Neurol Neurosurg*. 2004 Jun;106(3):270-4.
4. Prat E, Martin R. The immunopathogenesis of multiple sclerosis. *J Rehabil Res Dev*. 2002 Mar-Apr;39(2):187-99.
5. Abbas. *Imunologia Celular e Molecular*. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.
6. T. M. Rivers. DHS, D G. P. Berry.. Observation on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. *Journal of experimental medicine*. 1933 1933;58:39-53.
7. Olitsky PK, Yager RH. Experimental disseminated encephalomyelitis in white mice. *J Exp Med*. 1949 Sep;90(3):213-24.
8. Butterfield RJ, Blankenhorn EP, Roper RJ, Zachary JF, Doerge RW, Sudweeks J, et al. Genetic analysis of disease subtypes and sexual dimorphisms in mouse experimental allergic encephalomyelitis (EAE): relapsing/remitting and monophasic remitting/nonrelapsing EAE are immunogenetically distinct. *J Immunol*. 1999 Mar 1;162(5):3096-102.
9. Bernard CC, Johns TG, Slavin A, Ichikawa M, Ewing C, Liu J, et al. Myelin oligodendrocyte glycoprotein: a novel candidate autoantigen in multiple sclerosis. *J Mol Med*. 1997 Feb;75(2):77-88.
10. Genain CP, Cannella B, Hauser SL, Raine CS. Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. *Nat Med*. 1999 Feb;5(2):170-5.
11. Raine CS, Cannella B, Hauser SL, Genain CP. Demyelination in primate autoimmune encephalomyelitis and acute multiple sclerosis lesions: a case for antigen-specific antibody mediation. *Ann Neurol*. 1999 Aug;46(2):144-60.
12. Linington C, Berger T, Perry L, Weerth S, Hinze-Selch D, Zhang Y, et al. T cells specific for the myelin oligodendrocyte glycoprotein mediate an unusual autoimmune inflammatory response in the central nervous system. *Eur J Immunol*. 1993 Jun;23(6):1364-72.
13. Spahn TW, Issazadah S, Salvin AJ, Weiner HL. Decreased severity of myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide 33 - 35-induced experimental autoimmune encephalomyelitis in mice with a disrupted TCR delta chain gene. *Eur J Immunol*. 1999 Dec;29(12):4060-71.
14. Ransohoff RM, Howe CL, Rodriguez M. Growth factor treatment of demyelinating disease: at last, a leap into the light. *Trends Immunol*. 2002 Nov;23(11):512-6.
15. Boztug K, Carson MJ, Pham-Mitchell N, Asensio VC, DeMartino J, Campbell IL. Leukocyte infiltration, but not neurodegeneration, in the CNS of transgenic mice with astrocyte production of the CXC chemokine ligand 10. *J Immunol*. 2002 Aug 1;169(3):1505-15.
16. Zipp F. Apoptosis in multiple sclerosis. *Cell Tissue Res*. 2000 Jul;301(1):163-71.

17. Aloisi F, Serafini B, Adorini L. Glia-T cell dialogue. *J Neuroimmunol.* 2000 Jul 24;107(2):111-7.
18. Bauer J, Huitinga I, Zhao W, Lassmann H, Hickey WF, Dijkstra CD. The role of macrophages, perivascular cells, and microglial cells in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glia.* 1995 Dec;15(4):437-46.
19. Huitinga I, Ruuls SR, Jung S, Van Rooijen N, Hartung HP, Dijkstra CD. Macrophages in T cell line-mediated, demyelinating, and chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats. *Clin Exp Immunol.* 1995 May;100(2):344-51.
20. Massey EJ, Sundstedt A, Day MJ, Corfield G, Anderton S, Wraith DC. Intranasal peptide-induced peripheral tolerance: the role of IL-10 in regulatory T cell function within the context of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2002 Sep 10;87(3-4):357-72.
21. Kennedy MK, Torrance DS, Picha KS, Mohler KM. Analysis of cytokine mRNA expression in the central nervous system of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis reveals that IL-10 mRNA expression correlates with recovery. *J Immunol.* 1992 Oct 1;149(7):2496-505.
22. Khoury SJ, Hancock WW, Weiner HL. Oral tolerance to myelin basic protein and natural recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis are associated with downregulation of inflammatory cytokines and differential upregulation of transforming growth factor beta, interleukin 4, and prostaglandin E expression in the brain. *J Exp Med.* 1992 Nov 1;176(5):1355-64.
23. Karandikar NJ, Crawford MP, Yan X, Ratts RB, Brenchley JM, Ambrozak DR, et al. Glatiramer acetate (Copaxone) therapy induces CD8(+) T cell responses in patients with multiple sclerosis. *J Clin Invest.* 2002 Mar;109(5):641-9.
24. Bettelli E, Das MP, Howard ED, Weiner HL, Sobel RA, Kuchroo VK. IL-10 is critical in the regulation of autoimmune encephalomyelitis as demonstrated by studies of IL-10- and IL-4-deficient and transgenic mice. *J Immunol.* 1998 Oct 1;161(7):3299-306.
25. Samoilova EB, Horton JL, Chen Y. Acceleration of experimental autoimmune encephalomyelitis in interleukin-10-deficient mice: roles of interleukin-10 in disease progression and recovery. *Cell Immunol.* 1998 Sep 15;188(2):118-24.
26. Cua DJ, Groux H, Hinton DR, Stohlman SA, Coffman RL. Transgenic interleukin 10 prevents induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med.* 1999 Mar 15;189(6):1005-10.
27. Nagelkerken L, Blauw B, Tielemans M. IL-4 abrogates the inhibitory effect of IL-10 on the development of experimental allergic encephalomyelitis in SJL mice. *Int Immunol.* 1997 Sep;9(9):1243-51.
28. Kuruvilla AP, Shah R, Hochwald GM, Liggitt HD, Palladino MA, Thorbecke GJ. Protective effect of transforming growth factor beta 1 on experimental autoimmune diseases in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Apr 1;88(7):2918-21.
29. Tsunawaki S, Sporn M, Ding A, Nathan C. Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta. *Nature.* 1988 Jul 21;334(6179):260-2.
30. Menges M, Rossner S, Voigtlander C, Schindler H, Kukutsch NA, Bogdan C, et al. Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. *J Exp Med.* 2002 Jan 7;195(1):15-21.

31. Goddard CA, Butts DA, Shatz CJ. Regulation of CNS synapses by neuronal MHC class I. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Apr 17;104(16):6828-33.
32. Oliveira AL, Thams S, Lidman O, Piehl F, Hokfelt T, Karre K, et al. A role for MHC class I molecules in synaptic plasticity and regeneration of neurons after axotomy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Dec 21;101(51):17843-8.
33. Boulanger LM, Huh GS, Shatz CJ. Neuronal plasticity and cellular immunity: shared molecular mechanisms. *Curr Opin Neurobiol*. 2001 Oct;11(5):568-78.
34. 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 Dec 15;290(5499):2155-9.
35. Sabha M, Jr., Emirandetti A, Cullheim S, De Oliveira AL. MHC I expression and synaptic plasticity in different mice strains after axotomy. *Synapse*. 2008 Feb;62(2):137-48.
36. Neumann H, Schmidt H, Cavalie A, Jenne D, Wekerle H. Major histocompatibility complex (MHC) class I gene expression in single neurons of the central nervous system: differential regulation by interferon (IFN)-gamma and tumor necrosis factor (TNF)-alpha. *J Exp Med*. 1997 Jan 20;185(2):305-16.
37. Putheti P, Soderstrom M, Link H, Huang YM. Effect of glatiramer acetate (Copaxone) on CD4+CD25^{high} T regulatory cells and their IL-10 production in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2003 Nov;144(1-2):125-31.
38. Blanchette F, Neuhaus O. Glatiramer acetate: evidence for a dual mechanism of action. *J Neurol*. 2008 Mar;255 Suppl 1:26-36.
39. Aharoni R, Kayhan B, Eilam R, Sela M, Arnon R. Glatiramer acetate-specific T cells in the brain express T helper 2/3 cytokines and brain-derived neurotrophic factor in situ. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Nov 25;100(24):14157-62.
40. Aharoni R, Eilam R, Domev H, Labunskay G, Sela M, Arnon R. The immunomodulator glatiramer acetate augments the expression of neurotrophic factors in brains of experimental autoimmune encephalomyelitis mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Dec 27;102(52):19045-50.
41. Kirwin SJ, Dowdell KC, Hindinger C, Feng N, Bergmann CC, Hinton DR, et al. Altered neuroantigen-specific cytokine secretion in a Th2 environment reduces experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*. 2006 Sep;178(1-2):30-9.
42. Sanna A, Fois ML, Arru G, Huang YM, Link H, Pugliatti M, et al. Glatiramer acetate reduces lymphocyte proliferation and enhances IL-5 and IL-13 production through modulation of monocyte-derived dendritic cells in multiple sclerosis. *Clin Exp Immunol*. 2006 Feb;143(2):357-62.
43. Blanco Y, Moral EA, Costa M, Gomez-Choco M, Torres-Peraza JF, Alonso-Magdalena L, et al. Effect of glatiramer acetate (Copaxone) on the immunophenotypic and cytokine profile and BDNF production in multiple sclerosis: a longitudinal study. *Neurosci Lett*. 2006 Oct 9;406(3):270-5.
44. Kayhan B, Aharoni R, Arnon R. Glatiramer acetate (Copaxone) regulates nitric oxide and related cytokine secretion in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunol Lett*. 2003 Sep 8;88(3):185-92.
45. Aharoni R, Herschkovitz A, Eilam R, Blumberg-Hazan M, Sela M, Bruck W, et al. Demyelination arrest and remyelination induced by glatiramer acetate treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Aug 12;105(32):11358-63.

46. Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci.* 2006 Jan;7(1):41-53.
47. Mi H, Haerberle H, Barres BA. Induction of astrocyte differentiation by endothelial cells. *J Neurosci.* 2001 Mar 1;21(5):1538-47.
48. Shrikant P, Benveniste EN. The central nervous system as an immunocompetent organ: role of glial cells in antigen presentation. *J Immunol.* 1996 Sep 1;157(5):1819-22.
49. Krogsgaard M, Wucherpfennig KW, Cannella B, Hansen BE, Svejgaard A, Pyrdol J, et al. Visualization of myelin basic protein (MBP) T cell epitopes in multiple sclerosis lesions using a monoclonal antibody specific for the human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DR2-MBP 85-99 complex. *J Exp Med.* 2000 Apr 17;191(8):1395-412.
50. Vijayaraghavan S. Glial-Neuronal Interactions-Implications for Plasticity and Drug Addiction. *Aaps J.* 2009 Feb 24.
51. Wu VW, Schwartz JP. Cell culture models for reactive gliosis: new perspectives. *J Neurosci Res.* 1998 Mar 15;51(6):675-81.
52. Hulshof S, Montagne L, De Groot CJ, Van Der Valk P. Cellular localization and expression patterns of interleukin-10, interleukin-4, and their receptors in multiple sclerosis lesions. *Glia.* 2002 Apr 1;38(1):24-35.
53. Ledeboer A, Breve JJ, Wierinckx A, van der Jagt S, Bristow AF, Leysen JE, et al. Expression and regulation of interleukin-10 and interleukin-10 receptor in rat astroglial and microglial cells. *Eur J Neurosci.* 2002 Oct;16(7):1175-85.
54. Rho MB, Wesselingh S, Glass JD, McArthur JC, Choi S, Griffin J, et al. A potential role for interferon-alpha in the pathogenesis of HIV-associated dementia. *Brain Behav Immun.* 1995 Dec;9(4):366-77.
55. Benveniste EN. Cytokines: influence on glial cell gene expression and function. *Chem Immunol.* 1997;69:31-75.
56. Begolka WS, Vanderlugt CL, Rahbe SM, Miller SD. Differential expression of inflammatory cytokines parallels progression of central nervous system pathology in two clinically distinct models of multiple sclerosis. *J Immunol.* 1998 Oct 15;161(8):4437-46.
57. Windhagen A, Nicholson LB, Weiner HL, Kuchroo VK, Hafler DA. Role of Th1 and Th2 cells in neurologic disorders. *Chem Immunol.* 1996;63:171-86.
58. Hickey WF, Kimura H. Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science.* 1988 Jan 15;239(4837):290-2.
59. Takahashi JL, Giuliani F, Power C, Imai Y, Yong VW. Interleukin-1beta promotes oligodendrocyte death through glutamate excitotoxicity. *Ann Neurol.* 2003 May;53(5):588-95.
60. Zhu B, Luo L, Moore GR, Paty DW, Cynader MS. Dendritic and synaptic pathology in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol.* 2003 May;162(5):1639-50.
61. Linda H, Shupliakov O, Ornung G, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Risling M, et al. Ultrastructural evidence for a preferential elimination of glutamate-immunoreactive synaptic terminals from spinal motoneurons after intramedullary axotomy. *J Comp Neurol.* 2000 Sep 11;425(1):10-23.
62. Piani D, Frei K, Do KQ, Cuenod M, Fontana A. Murine brain macrophages induced NMDA receptor mediated neurotoxicity in vitro by secreting glutamate. *Neurosci Lett.* 1991 Dec 9;133(2):159-62.
63. Piani D, Frei K, Pfister HW, Fontana A. Glutamate uptake by astrocytes is inhibited by reactive oxygen intermediates but not by other macrophage-derived molecules including

- cytokines, leukotrienes or platelet-activating factor. *J Neuroimmunol.* 1993 Oct;48(1):99-104.
64. Geurts JJ, Wolswijk G, Bo L, van der Valk P, Polman CH, Troost D, et al. Altered expression patterns of group I and II metabotropic glutamate receptors in multiple sclerosis. *Brain.* 2003 Aug;126(Pt 8):1755-66.
 65. Kuhlmann T, Lingfeld G, Bitsch A, Schuchardt J, Bruck W. Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain.* 2002 Oct;125(Pt 10):2202-12.
 66. Konno H, Yamamoto T, Iwasaki Y, Saitoh T, Suzuki H, Terunuma H. Ia-expressing microglial cells in experimental allergic encephalomyelitis in rats. *Acta Neuropathol.* 1989;77(5):472-9.
 67. Mack CL, Vanderlugt-Castaneda CL, Neville KL, Miller SD. Microglia are activated to become competent antigen presenting and effector cells in the inflammatory environment of the Theiler's virus model of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2003 Nov;144(1-2):68-79.
 68. Matsumoto Y, Ohmori K, Fujiwara M. Microglial and astroglial reactions to inflammatory lesions of experimental autoimmune encephalomyelitis in the rat central nervous system. *J Neuroimmunol.* 1992 Mar;37(1-2):23-33.
 69. Kishino A, Ishige Y, Tatsuno T, Nakayama C, Noguchi H. BDNF prevents and reverses adult rat motor neuron degeneration and induces axonal outgrowth. *Exp Neurol.* 1997 Apr;144(2):273-86.
 70. Koliatsos VE, Price WL, Pardo CA, Price DL. Ventral root avulsion: an experimental model of death of adult motor neurons. *J Comp Neurol.* 1994 Apr 1;342(1):35-44.
 71. Novikov LN, Novikova LN, Holmberg P, Kellerth J. Exogenous brain-derived neurotrophic factor regulates the synaptic composition of axonally lesioned and normal adult rat motoneurons. *Neuroscience.* 2000;100(1):171-81.
 72. Lieberman AR. The axon reaction: a review of the principal features of perikaryal responses to axon injury. *Int Rev Neurobiol.* 1971;14:49-124.
 73. Snider WD, Elliott JL, Yan Q. Axotomy-induced neuronal death during development. *J Neurobiol.* 1992 Nov;23(9):1231-46.
 74. Marques KB, Santos LM, Oliveira AL. Spinal motoneuron synaptic plasticity during the course of an animal model of multiple sclerosis. *Eur J Neurosci.* 2006 Dec;24(11):3053-62.
 75. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet.* 2002 Apr 6;359(9313):1221-31.
 76. Vieira PL, Heystek HC, Wormmeester J, Wierenga EA, Kapsenberg ML. Glatiramer acetate (copolymer-1, copaxone) promotes Th2 cell development and increased IL-10 production through modulation of dendritic cells. *J Immunol.* 2003 May 1;170(9):4483-8.
 77. Kerfoot SM, Kubes P. Overlapping roles of P-selectin and alpha 4 integrin to recruit leukocytes to the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2002 Jul 15;169(2):1000-6.
 78. Abercrombie M, Johnson ML. Quantitative histology of Wallerian degeneration: I. Nuclear population in rabbit sciatic nerve. *J Anat.* 1946 Jan;80(Pt 1):37-50.
 79. Sakai K, Tabira T, Endoh M, Steinman L. Ia expression in chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis induced by long-term cultured T cell lines in mice. *Lab Invest.* 1986 Mar;54(3):345-52.

80. Rodrigues Hell RC, Silva Costa MM, Goes AM, Oliveira AL. Local injection of BDNF producing mesenchymal stem cells increases neuronal survival and synaptic stability following ventral root avulsion. *Neurobiol Dis.* 2009 Feb;33(2):290-300.
81. Linda H, Hammarberg H, Cullheim S, Levinovitz A, Khademi M, Olsson T. Expression of MHC class I and beta2-microglobulin in rat spinal motoneurons: regulatory influences by IFN-gamma and axotomy. *Exp Neurol.* 1998 Apr;150(2):282-95.
82. Linda H, Hammarberg H, Piehl F, Khademi M, Olsson T. Expression of MHC class I heavy chain and beta2-microglobulin in rat brainstem motoneurons and nigral dopaminergic neurons. *J Neuroimmunol.* 1999 Nov 1;101(1):76-86.
83. Zanon RG, Oliveira AL. MHC I upregulation influences astroglial reaction and synaptic plasticity in the spinal cord after sciatic nerve transection. *Exp Neurol.* 2006 Aug;200(2):521-31.
84. Almolda B, Costa M, Montoya M, Gonzalez B, Castellano B. CD4 microglial expression correlates with spontaneous clinical improvement in the acute Lewis rat EAE model. *J Neuroimmunol.* 2009 Feb 25.
85. Shijie J, Takeuchi H, Yawata I, Harada Y, Sonobe Y, Doi Y, et al. Blockade of glutamate release from microglia attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Tohoku J Exp Med.* 2009 Feb;217(2):87-92.
86. Aldskogius H, Liu L, Svensson M. Glial responses to synaptic damage and plasticity. *J Neurosci Res.* 1999 Oct 1;58(1):33-41.

Anexo

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Glatiramer acetate positively influences spinal motoneuron survival and synaptic plasticity after ventral root avulsion

Juliana Milani Scorisa, Renata Graciele Zanon, Camila Marques Freria, Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira*

Dept. of Anatomy - Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 8 September 2008
Received in revised form
27 November 2008
Accepted 10 December 2008

Keywords:
Ventral root avulsion
Spinal cord
Synapse elimination
Motoneuron
Immunomodulator
Glatiramer acetate

ABSTRACT

Avulsion of ventral roots induces degeneration of most axotomized motoneurons. At present there are no effective strategies to prevent such neuronal loss and to preserve the affected spinal circuits. Interestingly, changes in the spinal cord network also occur during the course of the experimental model of multiple sclerosis (experimental autoimmune encephalomyelitis—EAE). Glatiramer acetate (GA) significantly reduces the seriousness of the symptoms during the exacerbation of EAE. However, little is known about its effects on motoneurons. In the present study, we investigated whether GA has an influence on synapse plasticity and glial reaction after ventral root avulsion (VRA). Lewis rats were subjected to the avulsion of lumbar ventral roots and treated with GA. The animals were sacrificed after 14 days of treatment and the spinal cords processed for immunohistochemistry. A correlation between the synaptic changes and glial activation was obtained by performing immunolabeling against synaptophysin, GFAP and Iba-1. GA treatment preserved synaptophysin labeling, and significantly reduced the glial reaction in the area surrounding the axotomized motoneurons. After ventral root avulsion, GA treatment was also neuroprotective. The present results indicate that the immunomodulator GA has an influence on the stability of nerve terminals in the spinal cord, which may in turn contribute to future treatment strategies after proximal lesions to spinal motoneurons.

© 2008 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Traumatic lesions to the spinal cord, which involves neuronal death, convey devastating and permanent loss of function. Also, further damage develops in response to the local haemorrhage and ischemia [13,28]. At present, therapeutical approaches to avoid neuronal loss after proximal injuries are not sufficiently effective so that new pharmacological approaches may be of great importance.

An experimental model to investigate adult neuronal degeneration is the avulsion of ventral roots (VRA) at the surface of the spinal cord. The proximity of the lesion and its location at the border of the central nervous system (CNS) and peripheral nervous system (PNS) result in a neuronal loss of up to 80% during the first 2 weeks post-lesion [17,18,22,25]. Nevertheless, exogenous treatment with certain drugs and neurotrophic factors may positively influence neuronal survival and axonal regeneration [22,23].

A hallmark feature after VRA is the local inflammatory reaction with vigorous activation of resident glia, which may in turn affect spinal circuitry leading to the acute loss and reorganization of synapses. Such changes have been attracting much attention as

well as the neuroimmune interactions after lesion. In this sense, we have recently shown the occurrence of a massive loss of synapses in the sciatic motor pool during the course of the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), the experimental model for studying multiple sclerosis (MS) [21]. Such synaptic elimination may significantly contribute to the origin of the clinical signs of the disease, opening the possibility of a role for immunomodulating drugs on neuronal survival and for stabilizing of synaptic networks.

In fact, glatiramer acetate (GA) has been shown to be neuroprotective in different experimental models including the EAE [2,9,20]. It has also such effects in MS in humans [7,14] and after lesion of the optic nerve [15].

Although its mechanism of action is not completely known, the inhibition of CNS myelin antigens by competing as a MHC ligand may be of importance [8,26,29]. Also, the ability to stimulate proliferation of Th2 over Th1 cells, suppressing T-cell activity is of relevance as well [29]. However, it is possible that GA may act directly on neurons and glial cells, since MHC class I expression by such cell types has been linked to the synaptic elimination that occurs after lesion [24,30,31].

Nevertheless, the impact of GA on the nervous tissue, particularly on neurons during the course of the disease and after proximal lesions is virtually unknown. Based on the fact that GA influences cell proliferation as well as neurotrophic factor synthesis [32], it is

* Corresponding author at: Departamento de Anatomia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6109, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brazil. Tel.: +55 19 3521 6295; fax: +55 19 3521 6101.
E-mail address: alroliv@unicamp.br (A.L.R. de Oliveira).

Table 1

Absolute mean number of neurons sampled per section in the ipsilateral and contralateral sides of the spinal cord in the different experimental groups. The capital letters indicate the comparison between the experimental groups and sides analyzed so that different letters indicate statistical difference. The second row contains the mean diameter of the motoneurons in the different experimental conditions. Such numbers were used as the “d” value in the Abercrombie’s formula in order to calculate the motoneuron survival ratio. The small letters indicate the comparison between the experimental groups and sides analyzed so that different letters indicate statistical difference. Note that motoneurons from GA-treated animals (ipsilateral to the lesion) presented a larger cell body when compared to the placebo. Data is presented as mean $\pm$ S.D.

	Experimental groups			
	Avulsion + GA treatment (n = 5)		Avulsion + placebo (n = 5)	
	Ipsilateral	Contralateral	Ipsilateral	Contralateral
Number of neurons per section	3.32 $\pm$ 0.73 A	5.14 $\pm$ 0.34 C	1.69 $\pm$ 0.06 B	5.01 $\pm$ 0.09 C
Abercrombie’s formula: “d” value	47.63 $\pm$ 7.27 a	52.36 $\pm$ 5.89 c	38.71 $\pm$ 5.45 b	52.26 $\pm$ 6.33 c

possible that it might have a role in synaptic elimination/retraction, changing and reducing the seriousness of the response to injury as well as increasing neuronal survival.

Taking into account the possible influence of GA on plastic events in the spinal cord during the exacerbation of EAE, and based on the previous positive effects described in the recent literature, the present work investigated the synaptic elimination process as well as the glial reaction in the spinal cord after ventral root avulsion and GA treatment.

Twenty adult Lewis rats, 7 weeks old (~250 g of body weight), were obtained from the Multidisciplinary Centre for Biological Investigation (CEMIB/UNICAMP) and were housed using a 12 h light/dark cycle with free access to food and water. The rats were subjected to ventral root avulsion and divided in two groups: GA treatment and placebo. The Institutional Committee for Ethics in Animal Experimentation (CEE/IB/UNICAMP, proc. 794-2) approved the study, and the experiments were performed in accordance with the guidelines of the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA).

Adult rats were subjected to unilateral avulsion of the L4–L6 lumbar ventral roots, after unilateral laminectomy. The dural sac was opened by a longitudinal incision and, after dissection of the denticulate ligament, the spinal cord was gently twisted so that the ventral roots associated with the lumbar intumescence were identified and avulsed. After the lesion, the spinal cord was replaced in its original position and the musculature, fascia and skin were sutured in layers.

GA from batch 334190 (Teva, Israel) was used throughout the study. GA treatment was performed daily by subcutaneous injections (0.5 mg/animal/day) in phosphate buffer for 2 weeks. GA (n = 10) and placebo (n = 10) treatment was started 30 min after ventral root avulsion, being repeated daily by subcutaneous injections. The animals were sacrificed 2 weeks after the beginning of treatment.

Following the pre-determined survival period, the animals were anaesthetized with a mixture of Kensol (xylazine, Köning, Argentina, 10 mg/kg) and Vetaset (Cetamine, Fort Dodge, USA, 50 mg/kg) and the vascular system was rinsed by transcardial perfusion with phosphate buffer (pH 7.4). For the immuno-

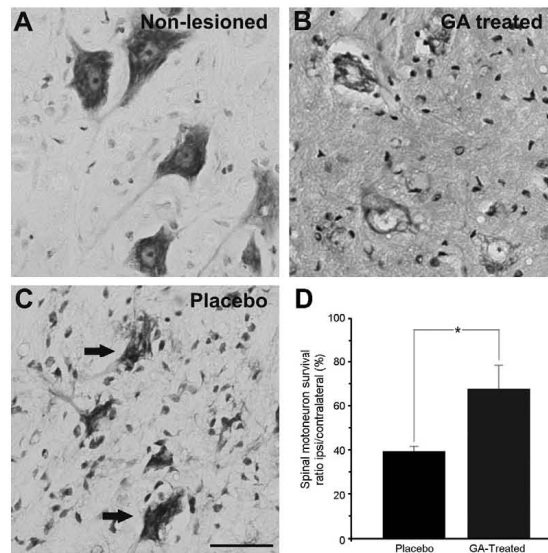


Fig. 1. Representative images of the sciatic nerve motor nucleus showing motoneuron cell bodies. (A) Non-lesioned, (B) GA treated and (C) placebo. The arrows indicate chromatolitic motoneurons which displayed a more intense reduction of cell body diameter after placebo treatment. (D) Percentage of spinal motoneuron survival after ventral root avulsion and treatment with placebo and glatiramer acetate (GA). Note a significant rescue of lesioned neurons after GA treatment (* $p < 0.05$). Scale bar = 50 μ m.

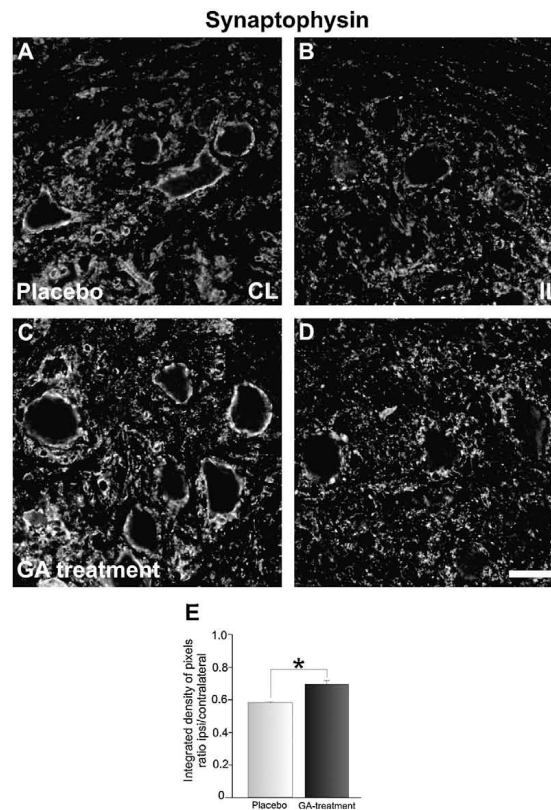


Fig. 2. Synaptophysin labeling after ventral root avulsion and treatment with glatiramer acetate (GA). Observe a significant increase of labeled synapses after GA treatment, indicating a preservation of inputs to lesioned spinal motoneurons. Scale bar = 50 μ m.

histochemical detection of synaptophysin, glial fibrillary acidic protein (GFAP) and Iba1, the rats were fixed by vascular perfusion with 4% paraformaldehyde in phosphate buffer (pH 7.4). Thereafter, the lumbar intumescence was dissected out, post-fixed overnight and then frozen. Cryostat transverse sections of the spinal cords were obtained and transferred to gelatine-coated slides, dried at room temperature for 30 min and stored at -20°C until analyzed.

Cell counts were performed double blindly on sections from the lumbar enlargement 14 days after surgery ($n = 5$). The animals were fixed by vascular perfusion with 4% formaldehyde in phosphate buffer (pH 7.4). The lumbar enlargement was then dissected out, post-fixed overnight in the same fixative and then frozen. Cryostat transverse sections (12 μ m) of the spinal cords were obtained and transferred to silane-coated slides, which were stained for 5–10 min in an aqueous 1% cresyl fast violet solution at 45°C . The sections were then washed in distilled water and mounted in a mixture of glycerol/PBS (3:1).

The motoneurons were identified based on their morphology and location in the ventral horn (dorsolateral lamina IX). Only cells with a visible nucleus and nucleolus were counted. The counts were made on 20 sections (every fourth section) along the lum-

bar enlargement both on the ipsilateral and contralateral sides of each rat. The absolute numbers of motoneurons on the lesioned and non-lesioned sides per section, respectively, were used to calculate the percentage of surviving cells in each specimen. To correct for double counting of neurons, the Abercrombie's formula [1] was used:

$$N = \frac{nt}{t + d}$$

where N is the corrected number of counted neurons, n is the counted number of cells, t is the thickness of the sections (12 μ m) and d is the average diameter of the cells. Once the difference in size significantly affects cell counts, the value of d was calculated specifically for each experimental group (ipsilateral and contralateral). In this sense, the diameter of 15 randomly picked neurons from each group was measured (ImageTool software, version 3.00, The University of Texas Health Science Center in Santo Antonio, USA) and the mean value calculated, as shown in Table 1.

Transverse sections of the spinal cord (12- μ m thick) were cut in a cryostat (Microm) and incubated with the following primary antibodies: rabbit anti-synaptophysin (Dako, 1:100), goat anti-GFAP

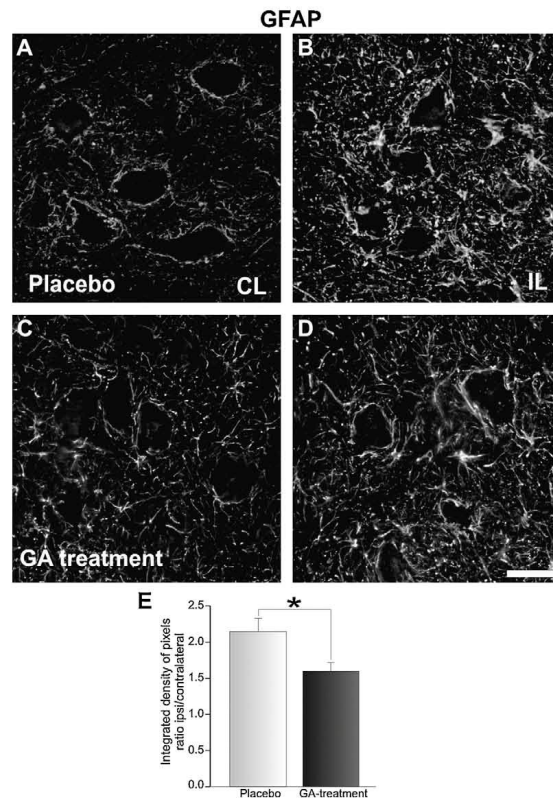


Fig. 3. GFAP labeling, an astroglial marker, after ventral root avulsion and treatment with glatiramer acetate (GA). The astrocytic reaction is significantly reduced by GA administration. Scale bar = 50 μ m.

(Chemicon, 1:200) and rabbit anti-Iba1 (Wako, 1:1400). Sections were incubated overnight in a moist chamber at 4 °C. The primary antisera were diluted in a solution containing BSA and Triton X in 0.01 M PBS. After rinsing, the secondary antibodies were applied and incubated for 45 min, according to the primary antibody hosts (CY-2 and CY-3, Jackson ImmunoResearch; 1:250). The sections were then rinsed in PBS, mounted in a mixture of glycerol/PBS (3:1), and observed under a fluorescence microscope (TS-100, Nikon, Tokyo, Japan) equipped with a CCD camera (DXM1200F, Nikon). For quantitative measurements, 3 representative images of the ipsi and contralateral ventral horn were captured from each animal for all experimental groups, totaling 15 sampled images from each side per group. Quantification was performed with the enhance contrast and density slicing feature of IMAGEJ software (version 1.33u, National Institutes of Health, USA). The integrated density of pixels was systematically measured in six representative areas of the lateral motor nucleus from each side (lesioned and unlesioned sides) [24]. The lesioned/unlesioned ratio of the integrated density of pixels was calculated for each section and then as mean value for each spinal cord.

Data were analyzed with a two-tailed Student's *t* test at $p < 0.05$ (*).

The hypothesis that GA displays neuroprotective properties has been accessed by counting the number of large motoneurons present in the dorsolateral motor nucleus at lamina IX in the spinal cord 2 weeks after a proximal mechanical lesion. Fig. 1 represents the percentage of neuronal survival 2 weeks after ventral root avulsion and treatment with GA or placebo solution. A neuroprotective effect of GA is depicted, which was statistically significant at $p < 0.05$, reflecting an approximately 40% increase in neuronal survival ($39.07\% \pm 2.31$, placebo; $67.42\% \pm 10.81$, GA treatment; mean ratio ipsilateral/contralateral $\pm$ S.D.). The absolute number of surviving motoneurons is presented in Table 1. Synaptophysin, GFAP and Iba-1 labeling after avulsion and treatment with GA.

In order to access any changes in synaptic activity after VRA and GA treatment, qualitative and quantitative analysis of the immunoreactivity of the synaptic protein synaptophysin were performed in the spinal cord motor nuclei in placebo and GA-treated avulsed animals. The synaptophysin immunolabeling results are presented in Fig. 2 and the quantitative analysis revealed that GA treatment preserved the immunolabeling ($p < 0.05$), especially at the surrounding of the lesioned motoneurons, presumably reducing the synaptic loss of inputs to the cell body as well as proximal dendrites. Additionally, by analyzing the GFAP expression at adja-

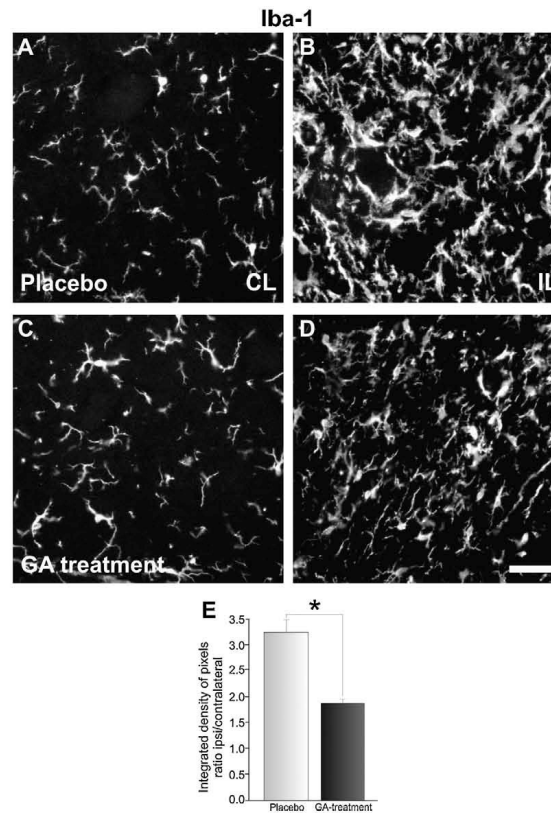


Fig. 4. Iba1 labeling, a microglial marker, after ventral root avulsion and treatment with glatiramer acetate (GA). The microglial reaction is significantly reduced by GA administration, which may positively influence the synaptic preservation as well as the motoneuron survival. Scale bar = 50 μ m.

cent sections (Fig. 3A–E), it was observed a reduction of astroglial reactivity, indicating a less intense astrocyte hypertrophy that normally follows VRA ($p < 0.05$). Similar results were obtained for Iba1 immunolabeling (Fig. 4), indicating a reduction of microglial activity after GA administration.

The present work demonstrates that glatiramer acetate, an immunomodulator drug used for treating MS patients, has a neuroprotective potential after a severe proximal lesion, namely the ventral root avulsion. In fact, it has been shown that GA-treated cells express the potent neurotrophic factor BDNF [3,4,16,27]. This may be of crucial importance regarding the increased survival ratio of avulsed motoneurons described herein.

At present, the treatment of the remittent/recurrent form of MS is based on the administration of glatiramer acetate and beta interferon [5,10,27]. Although both are approved drugs for MS treatment, GA has the unique characteristic of being a synthetic polymer composed of L-alanine, L-glutamine, L-lysine and L-tyrosine, exerting a marked suppressive and protective effect on EAE in various animal species [5]. Interestingly, although GA is not encephalitogenic, its therapeutic effect is related to the induction of both cellular and humoral immune responses in experimental models and in humans. Currently, its therapeutic effects are attributed to

the induction of specific Th2 suppressor cells that are able to release, upon an encephalitogenic stimulus, anti-inflammatory cytokines that minimize the progression of the disease [5].

Recent findings regarding synaptic plasticity during development and after injury in the adult indicate that neurons and glial cells may use “immune-like” machinery to communicate and signal for stabilization of inputs [12,24,31]. In this sense, apart from such an immunological role, it is possible that GA acts directly on the nervous tissue, cross-reacting with receptors expressed both by neurons and glia, stimulating, for example, the release of trophic and neurotrophic factors. In this sense, it has been reported that GA induces an elevation of BDNF, TGF β , IL-4 and 10 as well as suppresses TNF α and INF γ [4,11,32].

The above-mentioned effects of GA may directly influence the synaptic stability of the spinal cord circuits, which are perturbed after ventral root avulsion. The analysis of the immunohistochemistry results herein showed that GA treatment significantly preserved synaptophysin labeling in the spinal cord, during the period in which the placebo treated animals presented a great reduction in such immunolabeling.

The treatment with GA also reduced the glial reaction in the surroundings of the alpha motoneurons after VRA. Such reduction in

glial reactivity has been previously described as a factor influencing the formation of synapses *in vitro* and *in vivo* [6]. Additionally, GA has been shown to inhibit activation of NF- κ B, indicating a molecular basis for its anti-inflammatory and immunosuppressive effects [19].

In summary, the results presented in this study demonstrated that the immunomodulator GA not only possesses anti-inflammatory effects, but also influences the plasticity of neural elements in the spinal cord. An interpretation of this fact is the possible GA induced expression of neurotrophic factors, such as BDNF, NT-3, and NT-4 [4]. This hypothesis may be of relevance in the development of new strategies for the treatment of proximal lesions to the spinal cord. This may be accomplished by combining drugs capable of acting directly on the reactivity of glial elements and in turn increasing the stability of certain neural circuits.

Acknowledgements

This work was supported by FAPESP and CNPq. ALRO receives a fellowship from CNPq (Brazil).

References

- [1] M. Abercrombie, M.L. Johnson, Quantitative histology of Wallerian degeneration: I. Nuclear population in rabbit sciatic nerve, *J. Anat.* 80 (1946) 37–50.
- [2] R. Aharoni, R. Arnon, R. Eilam, Neurogenesis and neuroprotection induced by peripheral immunomodulatory treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis, *J. Neurosci.* 25 (2005) 8217–8228.
- [3] R. Aharoni, R. Eilam, H. Domev, G. Labunsky, M. Sela, R. Arnon, The immunomodulator glatiramer acetate augments the expression of neurotrophic factors in brains of experimental autoimmune encephalomyelitis mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (2005) 19045–19050.
- [4] R. Aharoni, B. Kayhan, R. Eilam, M. Sela, R. Arnon, Glatiramer acetate-specific T cells in the brain express T helper 2/3 cytokines and brain-derived neurotrophic factor *in situ*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (2003) 14157–14162.
- [5] S. Dhib-Jalbut, Glatiramer acetate (Copaxone) therapy for multiple sclerosis, *Pharmacol. Ther.* 98 (2003) 245–255.
- [6] A. Emirandetti, R. Graciele Zanon, M. Sabha Jr., A.L. de Oliveira, Astrocyte reactivity influences the number of presynaptic terminals apposed to spinal motoneurons after axotomy, *Brain Res.* 1095 (2006) 35–42.
- [7] M. Filippi, M. Rovaris, M.A. Rocca, M.P. Sormani, J.S. Wolinsky, S. Comi, European/Canadian Glatiramer Acetate Study Group, Glatiramer acetate reduces the proportion of new MS lesions evolving into “black holes”, *Neurology* 57 (2001) 731–733.
- [8] M. Fridkis-Hareli, D. Teitelbaum, E. Gurevich, I. Pecht, C. Brautbar, O.J. Kwon, T. Brenner, R. Arnon, M. Sela, 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.* 91 (1994) 4872–4876.
- [9] Y. Gilgun-Sherki, H. Panet, V. Holdengreber, R. Mosberg-Galili, D. Offen, Axonal damage is reduced following glatiramer acetate treatment in C57/bl mice with chronic-induced experimental autoimmune encephalomyelitis, *Neurosci. Res.* 47 (2003) 201–207.
- [10] R. Gold, C. Linington, H. Lassmann, Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research, *Brain* 129 (2006) 1953–1971.
- [11] H. Hammarberg, O. Lidman, C. Lundberg, S.Y. Eltayeb, A.W. Gielen, S. Muhallab, A. Svenningsson, H. Linda, P.H. van Der Meide, S. Cullheim, T. Olsson, F. Piehl, Neuroprotection by encephalomyelitis: rescue of mechanically injured neurons and neurotrophin production by CNS-infiltrating T and natural killer cells, *J. Neurosci.* 20 (2000) 5283–5291.
- [12] A. Holtz, B. Nystrom, B. Gerdin, Y. Olsson, Neuropathological changes and neurological function after spinal cord compression in the rat, *J. Neurotrauma* 7 (1990) 155–167.
- [13] G.S. Huh, L.M. Boulanger, H. Du, P.A. Riquelme, T.M. Brotz, C.J. Shatz, Functional requirement for class I MHC in CNS development and plasticity, *Science* 290 (2000) 2155–2159.
- [14] O. Khan, Y. Shen, C. Caon, F. Bao, W. Ching, M. Reznar, A. Buccheister, J. Hu, Z. Latif, A. Tselis, R. Lisak, Axonal metabolic recovery and potential neuroprotective effect of glatiramer acetate in relapsing-remitting multiple sclerosis, *Mult. Scler.* 11 (2005) 646–651.
- [15] J. Kipnis, E. Yoles, Z. Porat, A. Cohen, F. Mor, M. Sela, I.R. Cohen, M. Schwartz, T cell immunity to copolymer 1 confers neuroprotection on the damaged optic nerve: possible therapy for optic neuropathies, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 7446–7451.
- [16] S.J. Kirwin, K.C. Dowdell, C. Hindinger, N. Feng, C.C. Bergmann, D.R. Hinton, S.A. Stohlman, Altered neuroantigen-specific cytokine secretion in a Th2 environment reduces experimental autoimmune encephalomyelitis, *J. Neuroimmunol.* 178 (2006) 30–39.
- [17] A. Kishino, Y. Ishige, T. Tatsuno, C. Nakayama, H. Noguchi, BDNF prevents and reverses adult rat motor neuron degeneration and induces axonal outgrowth, *Exp. Neurol.* 144 (1997) 273–286.
- [18] V.E. Koliatsos, W.L. Price, C.A. Pardo, D.L. Price, Ventral root avulsion: an experimental model of death of adult motor neurons, *J. Comp. Neurol.* 342 (1994) 35–44.
- [19] Q.Q. Li, C.T. Bever, Glatiramer acetate blocks interleukin-1-dependent nuclear factor-kappaB activation and RANTES expression in human U-251 MG astroglial cells, *Brain Res. Mol. Brain Res.* 87 (2001) 48–60.
- [20] M. Maier, A.V. Kuhnert, N. Taheri, M.B. Sattler, M.K. Storch, S.K. Williams, M. Bahr, R. Diem, Effects of glatiramer acetate and interferon-beta on neurodegeneration in a model of multiple sclerosis: a comparative study, *Am. J. Pathol.* 169 (2006) 1353–1364.
- [21] K.B. Marques, L.M. Santos, A.L. Oliveira, Spinal motoneuron synaptic plasticity during the course of an animal model of multiple sclerosis, *Eur. J. Neurosci.* 24 (2006) 3053–3062.
- [22] L. Novikova, L. Novikova, J.O. Kellerth, Brain-derived neurotrophic factor promotes axonal regeneration and long-term survival of adult rat spinal motoneurons *in vivo*, *Neuroscience* 79 (1997) 765–774.
- [23] L. Novikova, L. Novikov, J.O. Kellerth, Effects of neurotransplants and BDNF on the survival and regeneration of injured adult spinal motoneurons, *Eur. J. Neurosci.* 9 (1997) 2774–2777.
- [24] A.L. Oliveira, S. Thams, O. Lidman, F. Piehl, T. Hokfelt, K. Karre, H. Linda, S. Cullheim, A role for MHC class I molecules in synaptic plasticity and regeneration of neurons after axotomy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (2004) 17843–17848.
- [25] F. Piehl, H. Hammarberg, G. Tabar, T. Hokfelt, S. Cullheim, Changes in the mRNA expression pattern, with special reference to calcitonin gene-related peptide, after axonal injuries in rat motoneurons depends on age and type of injury, *Exp. Brain Res.* 119 (1998) 191–204.
- [26] M.K. Racke, R. Martin, H. McFarland, R.B. Fritz, Copolymer-1-induced inhibition of antigen-specific T cell activation: interference with antigen presentation, *J. Neuroimmunol.* 37 (1992) 75–84.
- [27] A. Sanna, M.L. Fois, G. Arru, Y.M. Huang, H. Link, M. Pugliatti, G. Rosati, S. Sotgiu, Glatiramer acetate reduces lymphocyte proliferation and enhances IL-5 and IL-13 production through modulation of monocyte-derived dendritic cells in multiple sclerosis, *Clin. Exp. Immunol.* 143 (2006) 357–362.
- [28] C.H. Tator, I. Koyanagi, Vascular mechanisms in the pathophysiology of human spinal cord injury, *J. Neurosurg.* 86 (1997) 483–492.
- [29] D. Teitelbaum, M. Sela, R. Arnon, Copolymer 1 from the laboratory to FDA, *Isr. J. Med. Sci.* 33 (1997) 280–284.
- [30] S. Thams, A. Oliveira, S. Cullheim, MHC class I expression and synaptic plasticity after nerve lesion, *Brain Res. Rev.* 57 (2008) 265–269.
- [31] R.G. Zanon, A.L. Oliveira, MHC I upregulation influences astroglial reaction and synaptic plasticity in the spinal cord after sciatic nerve transection, *Exp. Neurol.* 200 (2006) 521–531.
- [32] T. Ziemssen, T. Kumpfel, W.E. Klinkert, O. Neuhaus, R. Hohlfield, Glatiramer acetate-specific T-helper 1- and 2-type cell lines produce BDNF: implications for multiple sclerosis therapy. Brain-derived neurotrophic factor, *Brain* 125 (2002) 2381–2391.