

# EFEITO DA TALIDOMIDA SOBRE O PROCESSO INFLAMATÓRIO E DESMIELINIZAÇÃO NA ENCEFALOMIELITE AUTO-IMUNE EXPERIMENTAL : ESTUDO HISTOPATOLÓGICO E EXPRESSÃO DE TNF- $\alpha$ E INOS

*EFFECT OF THALIDOMIDE ON THE INFLAMMATORY PROCESS AND DEMYELINATION IN EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE ENCEPHALOMYELITIS: HISTOPATHOLOGIC STUDY AND EXPRESSION OF TNF- $\alpha$  E INOS*

*Harleson Lopes de Mesquita\*, José Otávio do Amaral Correa\*\*, Fernando Monteiro Aarestrup\*\*\**

## RESUMO

A encefalomielite autoimune experimental (EAE) é uma doença inflamatória e desmielinizante do sistema nervoso central (SNC) caracterizada por incapacidades temporárias ou permanentes. A patogênese envolve a reação auto-imune associada com a produção de citocinas pró inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Esta citocina está associada com o aumento de radicais livres de oxigênio, como o óxido nítrico, liberados pelas células imunes ativadas. Além de aumentar a inflamação, tanto o fator de necrose tumoral, como o óxido nítrico causam lesão tecidual direta. Este estudo avaliou o efeito da talidomida na progressão clínica da doença, desenvolvimento da reação inflamatória e desmielinização. A expressão tecidual “in situ” do TNF- $\alpha$  e iNOS, uma enzima associada com a produção de óxido nítrico, foi investigada em amostras do SNC obtidos durante o desenvolvimento do modelo de EAE em ratos Lewis. Métodos: Ratos Lewis (n = 30) foram divididos em grupo de controle saudável (I), grupo experimental de encefalomielite autoimune (II) e o grupo tratado com talidomida (III). Os ratos foram monitorizados durante 15 dias para determinação da condição clínica, após este período, os animais foram eutanasiados e as amostras do sistema nervoso central foram obtidas para a realização de estudo histopatológico e imuno-histoquímico Resultados: Todos os animais do grupo II tiveram sintomas relacionados a EAE, enquanto apenas um do grupo tratado talidomida apresentaram alterações clínicas. O estudo histopatológico revelou que as amostras de SNC do grupo II apresentaram áreas de intenso infiltrado inflamatório mononuclear difuso e presença de áreas de desmielinização. No entanto, os animais tratados com talidomida apresentaram ocasionalmente um leve infiltrado inflamatório e bainhas de mielina bem organizadas. Além disso, a expressão de TNF- $\alpha$  e iNOS foram significativamente maiores no grupo II, quando comparado com o grupo tratado com a talidomida. Conclusões: Os resultados considerados em conjunto sustentam a hipótese de que a talidomida inibe a intensidade do processo inflamatório e desmielinização, assim como reduz a produção de mediadores inflamatórios modulando o desenvolvimento da encefalomielite auto-imune experimental em ratos Lewis.

## PALAVRAS-CHAVE

EAE, Talidomida, TNF- $\alpha$ , iNOS, desmielinização.

## ABSTRACT

Experimental autoimmune encephalomyelitis is a inflammatory and demyelinating disease of central nervous system (CNS) characterized by permanent or temporary disabilities. Its pathogenesis involves autoimmune reaction associated with the production of pro inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ). This cytokine is associated with increase of reactive oxygen free radicals, such as nitric oxide, released by activated immune cells. Besides enhancing inflammation, both tumor necrosis factor as nitric oxide cause pathologically direct destruction of proteins and enzyme oxidation. This study focuses on clinical disease progression, development of the inflammatory reaction and evaluation axonal myelination. The “in situ” tissue expression of the TNF- $\alpha$  and inducible nitric oxide synthase iNOS, an enzyme associated with the production of nitric oxide, were also investigated in CNS samples obtained during the development of experimental autoimmune encephalomyelitis model in Lewis rats. Methods: Lewis rats were used to perform the classical model of EAE. The rats (n=30) were divided into the healthy control group (I), experimental autoimmune encephalomyelitis group (II) and thalidomide treated group (III). The rats were monitored for 15 days for determination of clinical score, after this period, the animals were euthanized and samples were obtained from the central nervous system in which histopathological study and immunohistochemistry for SNC in situ detection of TNF- $\alpha$  and inducible nitric oxide synthase (iNOS)

were performed. Results: All animals of group II had symptoms related to experimental encephalomyelitis, while only one of the thalidomide treated group showed clinical changes. The histopathological study revealed that SNC samples of group II presented areas of intense focal and diffuse mononuclear inflammation and the myelin sheaths were scarce and poorly stained. However, thalidomide treated rats presented occasionally a mild perivascular inflammatory infiltrate and myelin sheaths were organized and well evidenced. In addition, the expression of TNF- $\alpha$  and iNOS were significantly higher in the group II when compared with thalidomide treated group. Conclusions: The results taken together support the hypothesis that thalidomide inhibits the intensity of the inflammation and demyelination process and as well as reduces the production of inflammatory mediators influencing the development of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats.

#### KEYWORDS

EAE, Thalidomide, TNF- $\alpha$ , iNOS, demyelination.

## 1 INTRODUÇÃO

Esclerose múltipla (EM) é uma doença autoimune caracterizada por episódios de lesões axonais e desmielinização no sistema nervoso central (SNC) apresentando como principais aspectos clínicos fraqueza muscular, desorientação, perda de equilíbrio e nos casos mais severos paralisia e morte<sup>11,17,21,29</sup>

Os processos que levam ao desenvolvimento da EM ainda devem ter seus detalhes esclarecidos, mas o envolvimento de linfócitos T CD4+ com o fenótipo Th1, produtores de citocinas inflamatórias e angiogênicas como TNF -  $\alpha$ , IL - 6 e o fator de crescimento endotelial vascular (vascular endothelial growth factor - VEGF), além de macrófagos e mediadores inflamatórios solúveis foram apontados por vários autores como importantes no desenvolvimento da doença<sup>12,14,15,20,27-29</sup>.

A dicotomia TH1/Th2 até então aceita na imunopatogênese de doenças como EM e em seu modelo experimental, a encefalomielite autoimune experimental (EAE) não explica completamente esses processos. A caracterização recente do fenótipo Th17, produtor de interleucina 17 (IL - 17) e sua demonstração como participante na fisiopatologia dessas doenças ampliou consideravelmente o campo de pesquisa e as possibilidades terapêuticas nessas áreas<sup>2,23</sup>.

Vários medicamentos têm sido investigados e testados para o tratamento da EM, já que o uso de corticóides para inibir o processo inflamatório da doença pode levar ao desenvolvimento de efeitos colaterais diversos como edema, risco de diabetes, elevação de pressão arterial e doenças infecciosas oportunistas<sup>1,7,8,30,32,34</sup>.

Como citado anteriormente a encefalomielite autoimune experimental (EAE) é o modelo usado por vários pesquisadores quando se deseja investigar novas possibilidades de tratamento para a EM devido a grande correlação imunológica entre ambas. Nesse modelo, animais como ratos (Lewis, Dark About) e camundongos (SJL, Balb/C e C57) são frequentemente usados nos experimentos<sup>5,18,19,26</sup>.

A talidomida é uma droga que tem sido usada para o tratamento de diversas doenças auto - imunes como o lupus eritematoso sistêmico (LES), artrite reumatóide e hanseníase<sup>33</sup>. É uma droga anti - angiogênica com efeito inibitório em relação ao TNF -  $\alpha$ , levando provavelmente a diminuição do processo inflamatório nessas patologias<sup>1,13,27,31,33</sup>.

Os efeitos da talidomida na diminuição de citocinas inflamatórias como TNF -  $\alpha$ , IFN -  $\gamma$  e em produtos originados de atividade inflamatória como o óxido nítrico na EAE já foram demonstrados experimentalmente<sup>4,7,13</sup>.

No presente estudo avaliamos em a expressão de TNF -  $\alpha$  no SNC de ratos Lewis tratados com talidomida. Os efeitos da talidomida sobre a produção in situ da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) também foi investigado durante o desenvolvimento da EAE.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 ANIMAIS

Foram obtidos do CEMIB - UNIPAMP - SP - Brasil ratos Lewis isogênicos, fêmeas com idade variando de 6 a 8 semanas, pesando 120 -150g. Os 30 animais usados nesse trabalho foram mantidos no Biotério do Centro de Biologia da Reprodução - UFJF. Foram divididos em 3 grupos de acordo com a distribuição abaixo:

a) Grupo controle negativo - 10 animais.

b) Grupo EAE (animais injetados com Macerado de cobaia e Adjuvante completo de Freund + 4 mg de Mycobacterium tuberculosis) - 10 animais.

Correspondence author: Fernando Monteiro Aarestrup. Campus Universitário UFJF - ICB, s/n, Martelos, Juiz de Fora/MG, Brasil. +55-032-21023212. fmaarestrup@hotmail.com

\* Aluno do programa de Pós-graduação em Saúde - Faculdade de Medicina Universidade Federal de Juiz de Fora - MG

\*\* Departamento de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora - MG

\*\*\* Laboratório de Imunopatologia e Patologia Experimental CBR, Universidade Federal de Juiz de Fora - MG

Received: 12/2012

Received: 04/2013

Agradecimentos : Estudo financiado pela Fundação de Amparo a Pesquisa de MG - FAPEMIG - processo APQ 02336-10

c) Grupo EAE e Tratados via subcutânea com 30 mg/Kg de talidomida ininterruptamente durante 15 dias – 10 animais.

É importante salientar que os 10 animais do controle negativo não receberam qualquer tipo de tratamento e foram sacrificados para análises padrão de clínica, histologia e análises sorológicas normais. Os demais foram divididos em três grupos como mostrado anteriormente e sacrificados no 15º dia pós-indução da EAE.

## 2.2 INDUÇÃO EAE

As medulas espinhais de cobaia (GPSC) e a cepa de *Mycobacterium tuberculosis* (ATCC H37 RA, Difco, Detroit, MI) utilizadas para indução da EAE foram gentilmente cedidas pela Dra. Thereza Fonseca Quírico do Santos da UFF.

Para preparar a emulsão antigênica completa (GPSC-CFA) foram feitas homogeneizações de uma parte de macerado de GPSC em duas partes de Adjuvante Incompleto de Freund (IFA) acrescido de 4 mg de *Mycobacterium tuberculosis* (MBT H37 RA, Difco, Detroit, MI) por mililitro de adjuvante, formando assim o Adjuvante Completo de Freund (CFA).

A emulsão foi preparada à temperatura ambiente, através da aspiração e ejeção continuada dos componentes por aproximadamente 20 minutos e foi considerada pronta quando ao se pingar uma gota sobre a água esta se mantinha íntegra. Foram utilizados frascos e seringas plásticas estéreis e agulhas 25 x 12 mm. Seu preparo aconteceu imediatamente antes do uso<sup>5</sup>

Os animais foram inoculados 100L de emulsão antigênica, sendo injetadas no coxim plantar da pata traseira e feita à marcação auricular dos grupos. Depois da inoculação os animais foram observados diariamente por duas horas por um período de 15 dias ininterruptos e os sinais clínicos foram registrados<sup>10,19</sup>.

## 2.3 TRATAMENTO APÓS A INDUÇÃO DE EAE

Após a indução da EAE os animais foram tratados durante 15 dias ininterruptos com talidomida sobre condições assépticas. Os ratos receberam injeções subcutâneas com 30 mg/Kg de talidomida (Grunenthal GMBH, Stolberg, Alemanha). A talidomida foi dissolvida em dimetil sulfoxido (DMSO) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) e salina estéril com concentração final de 90mg/mL. A concentração final de DMSO foi de 2%<sup>1</sup>.

## 2.4 AVALIAÇÃO CLÍNICA

Depois da inoculação os animais foram observados diariamente por duas horas por um período de 15 dias ininterruptos e os sinais

clínicos foram registrados de acordo com LEADBETTER (1998) e MOHAMED et al (2004). (Quadro 1)

ESCORE	SINAIS CLÍNICOS
0	SADIO
1	PERDA DE TÔNUS DA CAUDA
2	PARALISIA PARCIAL MEMBROS POSTERIORES
3	PARALISIA SEVERA MEMBROS POSTERIORES
4	TETRAPLEGIA
5	MORTE

Quadro I: Escore clínico dos ratos Lewis com EAE.

## 2.5 OBTENÇÃO DE PLASMA E DE TECIDO NERVOSO

Os animais foram eutanasiados no 15º dia do experimento com sobredose de anestesia com xilaxina (20mg/Kg) e quetamina (50 mg/kg). As amostras de sangue foram obtidas por punção cardíaca e o plasma isolado foi alíquotado em microtubos tipo “ependorf” e imediatamente armazenados em “freezer” a -70°C para posterior análise das moléculas imunomoduladoras.

O encéfalo e a medula espinhal foram dissecados fixados em formol tamponado a 10% (4g de fosfato de sódio monobásico, 6,5 g de fosfato de sódio dibásico, 100mL de formol PA e 900 mL de água destilada).

As amostras do SNC foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (70%, 90% e 100%) em banhos de 1 hora cada, sendo feitos 3 banhos em álcool absoluto. Posteriormente, foram clarificados em 3 banhos em xilol de 1 hora cada e finalmente feita à impregnação em parafina em estufa a 58°C e a inclusão na parafina a temperatura ambiente. Os blocos foram então cortados em micrótono modelo “820” Spencer com espessura de 6m para colorações de hematoxilina – eosina e Hematoxilina Férrica de Weigert – Pal – Russel.

## 2.6 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO

O material obtido do SNC foi submetido a processamento histopatológico de rotina e corados pela H.e. A análise histopatológica foi feita em ensaio duplo cego por 2 diferentes patologistas e fotomicrografias foram feitas usando equipamento Carl Zeiss (Alemanha).

### 2.6.1 COLORAÇÃO PELA HEMATOXILINA FÉRRICA DE WEIGERT – PAL – RUSSEL

Esta técnica utilizada para visualização geral do tecido nervoso e principalmente da bainha de mielina. Nesta coloração a bainha é

corada em azul-negro, as células nervosas em variações de amarelo-palha a cinzento, os nucléolos e os eritrócitos em negro e o fundo incolor.

Após desparafinar as lâminas, estas foram lavadas em água corrente por 3 minutos e tratadas em solução aquosa de sulfato férrico amoniacal a 4% por 3 minutos. Após esse procedimento foram lavadas rapidamente em água corrente e em seguida coradas pela hematoxilina férrica de Weigert – Pal – Russel (Hematoxilina a 10% em álcool absoluto 20 mL, carbonato de lítio 1g em 80 mL de água corrente) por 15 minutos. As lâminas foram lavadas por várias passagens em água corrente, secas e montadas.

## 2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Dados foram expressos em média e  $\pm$  desvio padrão e análise estatística realizada pelo programa Graphpad Instat e o teste de Dunn's com Kruskal – Wallis utilizado, sendo considerado nível de significância  $P < 0,05$

## 3 RESULTADOS

### 3.1 CURSO CLÍNICO DA EAE

Os 30 ratos utilizados foram acompanhados clinicamente durante todo o experimento. Os grupos se comportaram de maneira diferente durante a realização do experimento. Para o grupo controle foram utilizados dez ratos e em nenhum momento foi observado qualquer sinal clínico neurológico da EAE, tais como perda do tônus da cauda (escore 1), paralisia parcial dos membros posteriores (escore 2), paralisia severa dos membros posteriores (escore 3), tetraplegia e animais moribundos (escore 4) ou morte dos animais (escore 5).

Os ratos Lewis inoculados com GPSC – CFA começaram a apresentar os sintomas da EAE em torno do sexto dia após a inoculação. Neste estágio dois animais apresentavam flacidez e atonia caudal (escore 1). No oitavo dia após a indução todos os animais já apresentavam queda da cauda (escore 1), porém a maioria dos animais ainda apresentavam os movimentos dos membros anteriores e posteriores preservados exceto um animal com paralisia parcial dos membros posteriores (escore 2). Em torno do 10º dia pós inoculação os animais apresentavam-se agitados e com certa dificuldade de movimentar-se. Neste dia sete animais apresentavam paralisia parcial de membros posteriores (escore 2) e dois animais já apresentavam paralisia severa de membros posteriores (escore 3). Do 13º ao 14º dia de experimento os animais continuavam todos com sintomas da EAE, sendo que, sete animais apresentavam paralisia severa dos membros posteriores (escore 3), dois animais apresentavam tetraplegia e estado moribundo (escore 4) e um

animal paralisia parcial dos membros posteriores (escore 2) (gráfico 1). A tabela 1 representa o escore clínico da EAE no dia do sacrifício dos animais, ou seja, no 15º dia pós-indução da EAE.

Os animais inoculados com GPSC – CFA e tratados durante os 15 dias por via subcutânea com 30 mg/Kg de talidomida apresentaram resultados completamente diferentes do grupo anterior. Apenas um animal (A) apresentou sintomas neurológicos da EAE. Sintoma este que se iniciou em torno do 7º dia com perda de tônus da cauda (escore 1), passou a apresentar paralisia parcial dos membros posteriores (escore 2) no 10º dia pós-inoculação e finalmente paralisia severa dos membros posteriores no dia do sacrifício (15º dia pós-inoculação) (tabela 1).

A tabela 1 mostra o escore clínico apresentado pelos dez animais de Cada grupo no dia do sacrifício (15º dia pós-inoculação) e a média do escore apresentada pelos animais dos grupos EAE, sem e com tratamento.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	MÉDIA 15º dia
I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
II	3	3	3	3	4	3	4	3	3	2	3,1**
III	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,3**

Tabela 1: Efeito da talidomida no escore clínico da EAE no 15º dia pós-indução. \* $p < 0,0001$  entre o Grupo EAE e o Grupo Controle e \*\* $p < 0,001$  entre grupo EAE e grupo EAE + talidomida.

### 3.2 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA DO SNC DE RATOS COM EAE TRATADOS COM TALIDOMIDA

Foram analisadas amostras de tecido de medula espinhal, cérebro e cerebelo, de todos os animais do experimento, observando-se as características corticais particulares de cada órgão, bem como as características da substância branca. Morfologia neuronal, presença e estrutura de fibras, celularidade do neurópilo, bem como intensidade, localização e composição de infiltrados inflamatórios foram os aspectos observados na avaliação. A análise histológica das amostras da substância branca de todos os órgãos do grupo controle, coradas por hematoxilina e eosina (HE) revelou características compatíveis com as descritas na literatura <sup>5</sup>

A avaliação da substância branca da medula espinhal do grupo controle, coradas por HE revelou neurópilo típico, com grande emaranhado de prolongamentos celulares gliais e provenientes de corpos de neurônios das áreas corticais. Em meio ao neurópilo, núcleos das células da neuroglia, com morfologia sugestiva de astrócitos, oligodendrócitos, intensamente basofílicos e com halo perinuclear resultante de vacuolização citoplasmática típica do processamento histológico, conferindo a estas células aparência

semelhante a “ovo frito”. Não foram constantemente identificadas na extensão dos cortes células com morfologia sugestiva de micróglia, normalmente menos numerosas no parênquima cerebral normal no animal controle (Figura 1).

As amostras do grupo EAE, coradas por HE, apresentaram em diversas áreas corticais e da substância branca, intenso infiltrado inflamatório perivascular, composto predominantemente por células mononucleares, com núcleos redondos intensamente basofílicos e citoplasma escasso. Associadas ao infiltrado, acúmulos de células com núcleo achatado fusiforme bem corado, associado à microgliose (setas). O neurópilo, especialmente na substância branca medular, apresentou esparsamento entre os prolongamentos e maior celularidade glial quando comparado ao grupo controle (Figura 1).

A avaliação das amostras provenientes do grupo tratado com a talidomida apresentou ora áreas de reação inflamatória focal escassa, com discreto infiltrado tecidual composto por células mononucleares, ora ausência de reação inflamatória. Em diversas áreas foram observadas fibras mielínicas pouco numerosas, porém bem estruturadas, envolvidas por neurópilo eosinofílico. (Figura 1).

A avaliação da substância branca do cérebro e cerebelo do grupo controle, coradas por HE revelou muitas fibras mielínicas, bem organizadas, em orientações transversais e longitudinais, em toda a extensão das amostras. Nos cortes transversais observa-se mais facilmente axônio central envolvido por estrutura mielinizada delicada discretamente corada pela eosina. (Figura 1).

Para avaliação da bainha de mielina a coloração de hematoxilina férrica Weigert – Pal - Russell mostrou, nas amostras do grupo controle, muitos envoltórios em cor azul-negro bem estruturados, por toda a extensão dos cortes nas áreas de substância branca. Tais estruturas se tornaram facilmente visíveis devido ao contraste com o neurópilo, incolor, ao fundo (Figura 2). No grupo EAE, as bainhas mielínicas se apresentaram delicadas, irregulares, sendo ausentes em diversas regiões nos campos focalizados (Figura 2). No grupo talidomida foram observadas grande densidade de bainhas de mielina orientadas de forma longitudinal e transversal, fortemente coradas em azul (Figura 2). A marcação imuno-histoquímica demonstrou uma intensa produção de iNOS e TNF-alfa em amostras teciduais obtidas do grupo de animais controle positivo que desenvolveu a EAE. Os animais tratados com talidomida apresentaram uma redução acentuada da marcação para estas moléculas avaliadas. O estudo Imuno-histoquímico sugere que a talidomida foi capaz de inibir *in situ* a produção de iNOS- (Figura 3) e TNF-alfa- (Figura 4).

#### 4 DISCUSSÃO

A EAE representa um modelo clínico experimental para a esclerose múltipla, doença desmielinizante e crônica do SNC dos

homens, esta afeta principalmente adultos jovens do sexo feminino, caracterizando-se por períodos de recaída e remissão clínica que provocam incapacitações temporárias ou mesmo permanentes <sup>6,21,25,29</sup>. Repetições dos surtos são características marcantes desta doença. O termo esclerose múltipla é decorrente das múltiplas áreas de cicatrização (esclerose) que representam muitos focos de desmielinização no sistema nervoso central. Como a doença, freqüentemente, piora lentamente no decorrer do tempo, os indivíduos afetados apresentam períodos de saúde relativamente normal (remissões) alternados com períodos de exacerbações<sup>6</sup>. Estudos de ressonância magnética nuclear mostraram que áreas novas e recorrentes de inflamações e desmielinizações continuam a ocorrer mesmo durante os períodos de remissões clínicas, indicando uma atividade contínua da doença <sup>25</sup>. Os estudos nas áreas de imunologia e patologia de pacientes com EM, sustentam a hipótese de que o evento central no início das lesões seria orquestrado por linfócitos T CD4+ auto-reativos pois penetram no parênquima cerebral atravessando a barreira hematoencefálica e após contato com os antígenos, desencadeiam uma cascata de eventos que culminará com a formação de placas desmielinizantes agudas <sup>11</sup>.

A EAE nos ratos Lewis, apesar de apresentar poucas desmielinizações e ser uma doença monofásica aguda, é um importante modelo da EM <sup>24</sup>. Nesta doença autoimune do sistema nervoso central células T apresentam severa reatividade contra proteínas da bainha de mielina, incluindo a proteína básica de mielina (MBP), proteína proteolípídica (PLP) e glicoproteína oligodendrócito da mielina (MOG)<sup>18</sup>. A EM apresenta lesões desmielinizantes principalmente provocadas por linfócitos Th1, com altos níveis de IFN- $\gamma$  e potente ativação de macrófagos <sup>35</sup>.

Os sinais clínicos desenvolvidos pelos animais com EAE durante os experimentos mostraram um curso semelhante ao descrito na literatura: perda de tonicidade da cauda, paralisia da cauda, perda de movimentos parciais de membros posteriores, paralisia total dos membros posteriores e até tetraplegia e estado moribundo <sup>19</sup>. Os animais não apresentaram, pelo menos até o 15º dia, nenhum óbito, como é descrito por alguns autores na indução da EAE <sup>18</sup>. Em nosso trabalho, os animais do grupo EAE iniciaram os sintomas em torno do sexto e sétimos dias, semelhante ao mostrado na literatura <sup>35</sup>. Apresentando queda de tônus da cauda e uma evolução progressiva dos sintomas evoluindo na sua maioria para paralisia severa dos movimentos dos membros posteriores (sete animais) a até tetraplegia e estado moribundo (dois animais) em torno do 15º dia. Salientando ainda que todos os animais (n=10) apresentaram sintomas da EAE. Na fase final do curso clínico (15º dia) os animais apresentaram um escore clínico médio (3,1) compatível com paralisia severa dos membros posteriores.

Existe uma relação estreita entre severidade da doença e ruptura de integridade da barreira hematoencefálica levando a um aumento

do infiltrado mononuclear no SNC e edema associado <sup>35</sup>. Com a finalidade de investigar o desenvolvimento da reação inflamatória e o processo de desmielinização do SNC foram feitas colorações histológicas com HE e hematoxilina férrica de Weigert – Pal – Russell em amostra de cérebro e medula espinhal.

O estudo histopatológico os animais do grupo EAE apresentaram intenso infiltrado inflamatório mononuclear no cérebro e principalmente na medula espinhal. Estes dados corroboram com achados da literatura citados anteriormente na literatura <sup>16,32</sup>. O tratamento com talidomida promoveu uma redução do infiltrado inflamatório mononuclear no cérebro e na medula de ratos Lewis com EAE quando comparado com os achados dos animais do grupo EAE. Achados semelhantes foram observados no estudo com sinemina <sup>35</sup> e nos animais Knock out (KO) para TNF- $\alpha$  <sup>9</sup>. Nos animais KO para TNF- $\alpha$  as áreas de desmielinizações próximas aos infiltrados foram significativamente menores que nos animais controle que apresentavam muitas áreas desmielinizadas, principalmente na medula espinhal <sup>9</sup>.

Desmielinizações estão presentes tanto no cérebro quanto na medula espinhal de ratos Lewis com EAE <sup>5</sup>, e estas áreas desmielinizadas estão normalmente próximas à presença de infiltrados inflamatórios <sup>5,16,35</sup>. Estas áreas de desmielinizações estão presentes não somente em ratos Lewis <sup>5,35</sup> como também em outros animais como camundongos C57Bl/6 e SJL <sup>35</sup>.

Em nosso trabalho utilizamos coloração de hematoxilina férrica de Weigert – Pal – Russell para analisar a integridade das fibras mielínicas. Foram evidenciadas áreas de desmielinizações na substância branca da medula espinhal dos animais com a EAE no 15º dia da doença, em contraste com a integridade das bainhas de mielina na medula espinhal dos animais controle negativo. Também foram demonstrados em animais tratados com talidomida uma maior integridade dessas bainhas. Isto mostra, um provável efeito protetor desta droga em relação aos mecanismos desmielinizantes da EAE.

A importância da resposta Th1, infiltrado inflamatório e desmielinizações também foram evidenciados nos estudos de STUVE e colaboradores (2006). Foram observados que camundongos SJL/J com EAE induzida por MBP apresentavam elevados níveis de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , grande infiltrado inflamatório (HE) e áreas de desmielinização (Luxol faz blue) no cérebro e medula espinhal. Quando realizaram tratamentos destes animais com acetato de glatiramer (COPOLÍMERO) associado à atorvastatina houve redução dos níveis de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e elevação dos níveis de IL-4 e IL-10 (resposta Th2), redução do infiltrado inflamatório mononuclear e poucas áreas de desmielinizações na medula espinhal.

Os dados do estudo histopatológico demonstram uma correlação entre a intensidade de desenvolvimento do processo inflamatório e presença de áreas de desmielinização. Os resultados

de nosso estudo histopatológico demonstram que a talidomida foi significativamente eficaz em inibir o processo inflamatório e processo de desmielinização.

Há dados relevantes também quando são comparados os achados histopatológicos, imuno-histoquímicos e o escore clínico, visto que ocorreu uma correlação entre escore clínico elevado, infiltrado inflamatório bem desenvolvido no SNC e áreas de desmielinização. Em nosso experimento, o fato de apenas um animal tratado com talidomida ter desenvolvido EAE certamente está associado à capacidade da talidomida de inibir o infiltrado inflamatório e a desmielinização. Adicionalmente, foi observada a redução *In-situ* da produção de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) em animais tratados com talidomida. Os dados em conjunto suportam a hipótese de que a talidomida atua inibindo a produção destes mediadores inflamatórios sendo capaz de alterar a evolução da EAE em ratos Lewis modulando a resposta inflamatória e o processo de desmielinização.

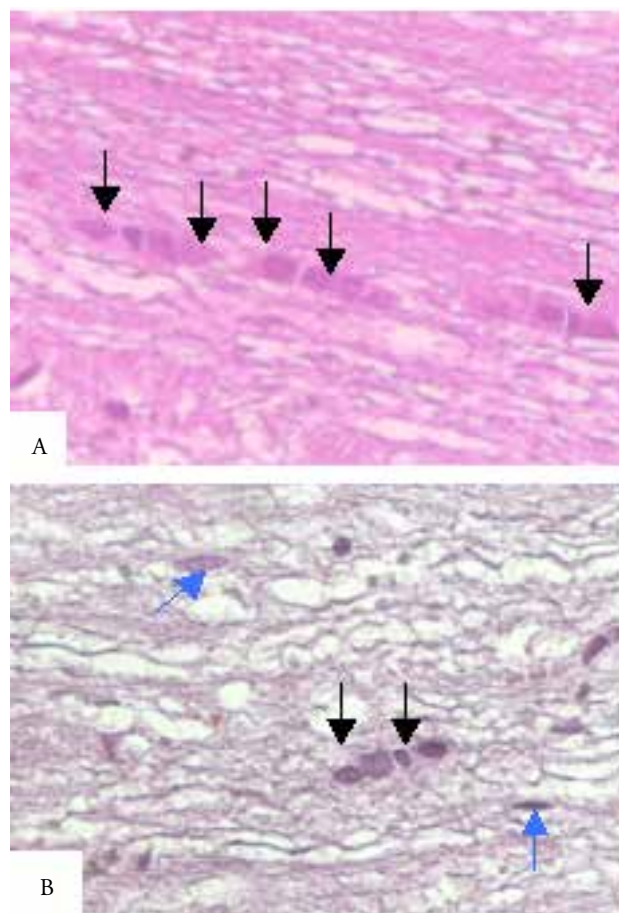


Figura 1: A: Corte histológico da substância branca do cerebelo do grupo controle. Oligodendróglia disposta tipicamente entre fascículos de axônios mielinizados (setas). Coloração HE. Aumento original 400X. B: Corte histológico da substância branca do cerebelo do grupo talidomida. Fibras mielínicas bem definidas morfológicamente em corte longitudinal e oligodendróglia associada (setas), celularidade glial com morfologia sugestiva de micróglia (setas azuis). Coloração HE. Aumento original 400X.



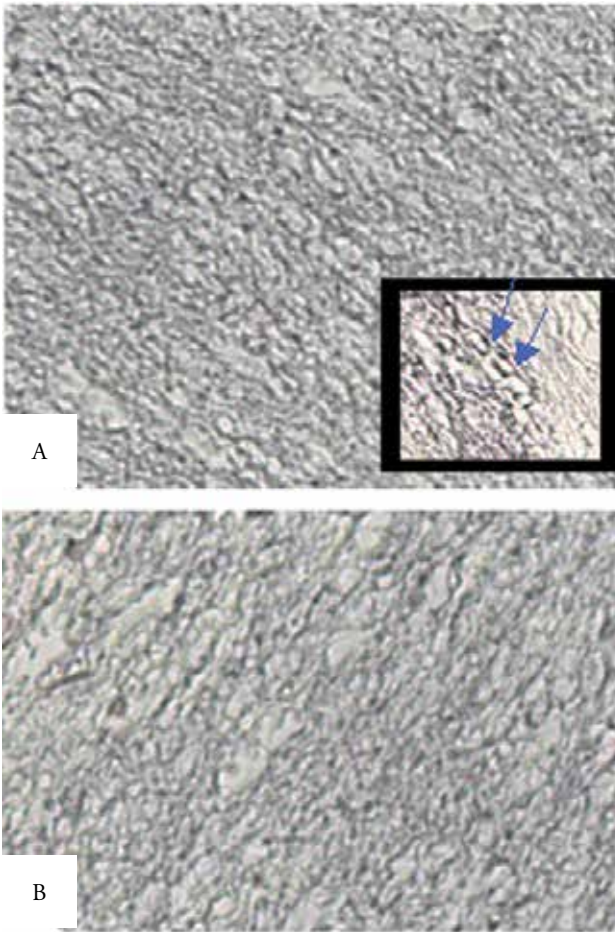


Figura 2: Marcação histoquímica para bainha de mielina. A: Corte histológico da substância branca da medula espinhal do grupo controle apresentando bainhas de mielina dispostas na orientação longitudinal em sua maioria em cor azul-negro contrastando com o neurópilo incolor ao fundo. Em detalhe: nódulos de Ranvier (setas azuis). Aumento 1000X. Coloração Hematoxilina férrica - Weigert. Aumento original 400X. D: Corte histológico da substância branca da medula espinhal do grupo talidomida apresentando numerosas bainhas de mielina em orientação longitudinal coradas em azul-negro. Coloração Hematoxilina férrica - Weigert. Aumento original 400X.

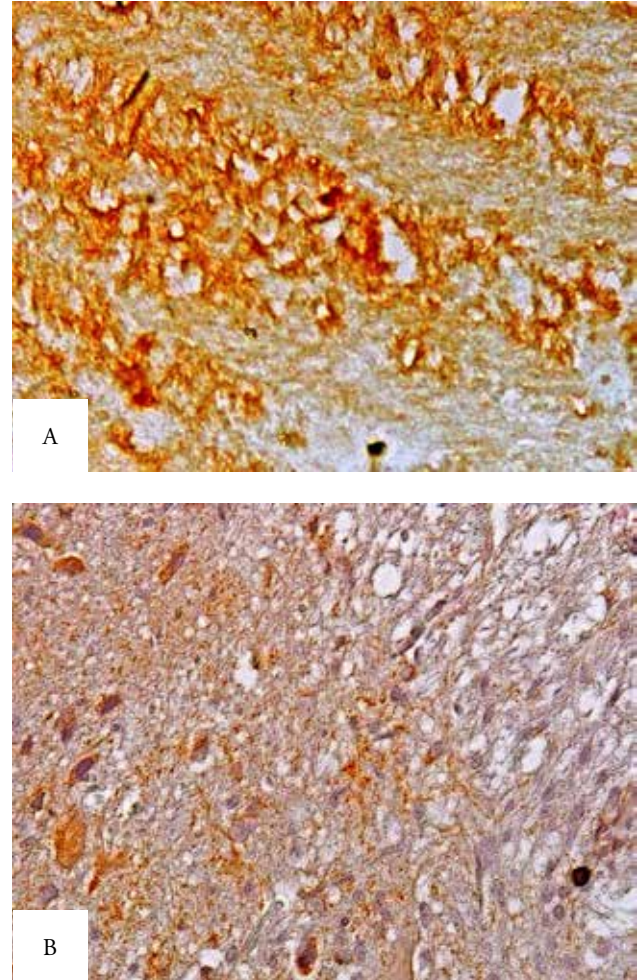


Figura 3: Marcação Imuno histoquímica òxido nítrico sintase iNOS. A: Corte histológico da substância branca da medula espinhal do grupo controle demonstrando intensa marcação positiva para iNOS difusamente distribuída. Aumento original 400X. B: Corte histológico da substância branca da medula espinhal do grupo tratado demonstrando imunomarcação positiva para iNOS localizada em grupos de células. Aumento original 400X.

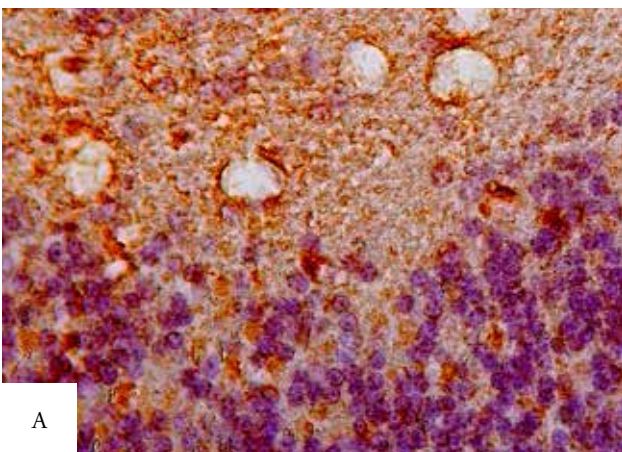


Figura 3: Marcação Imuno histoquímica para TNF- $\alpha$  A: Corte histológico da substância branca da medula espinhal do grupo controle apresentando imuno-marcação positiva para TNF- $\alpha$  intensa e difusamente distribuída. Aumento original 400X. B: Corte histológico da substância branca da medula espinhal do grupo tratado mostrando leve imuno-marcação positiva para TNF- $\alpha$ . Aumento original 400X.

## 5 REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F.M.; GONÇALVES-da-COSTA, S.C.; SARNO, E.N. The effect of thalidomide on BCG-induced granulomas in mice. *Bras J Med Biol Res.* 28: 1069 – 1076, 1995.
- ARANAMI, T.; YAMAMURA, T. Th17 cells and autoimmune encephalomyelitis (EAE/MS). *Allergy International.* 57: 115-120, 2008.
- BEHMER, Oswaldo Arruda. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. 2ª ed. Manole, Barueri, SP, 2003.
- BRENNER, T.; BROCKE, S.; SZAFER, F.; SOBEL, R. A.; PARKINSON, J. F.; PEREZ, D. H.; STEINMAN, L. Inhibition of nitric oxide synthase for treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 158(6): 2940 – 2946, 1997.
- CARVALHO, M.C.; CHIMELLI, L.M.; QUIRICO-SANTOS, T. Modulation of fibronectin expression in the central nervous system of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Bras J Med Biol Res.* 32(5):583-92, 1999.
- CATTELAN, A. V.; MOTA, C. B. Análise Cinemática da Marcha em Portadores de Esclerose Múltipla – Um Estudo de Caso, 2003. Disponível em [http://www.wgate.com.br/conteudo/fisioterapia/neuro/analise\\_cinematica](http://www.wgate.com.br/conteudo/fisioterapia/neuro/analise_cinematica) [Acessado em: 03 /08/ 2004].
- CORRÊA, J.O.A.; AARESTRUP, B.J.V.; AARESTRUP, F.M. Effect of thalidomide and pentoxifylline on experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Experimental Neurology.* 226: 15 – 23, 2010.
- DE JAGER, P.; & Haffler, D. New Therapeutic approaches for multiple sclerosis. *Ann Review of Medicine.* 58: 417 -432. 2007.
- FABIS MJ, SCOTT GS, KEAN RB, KOPROWSKI H, HOOPER DC. Loss of blood-brain barrier integrity in the spinal cord is common to experimental allergic encephalomyelitis in knockout mouse models. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104: 5656-5661, 2007.
- FARIA AM, WEINER HL. Oral tolerance: therapeutic implications for autoimmune diseases. *Clin Dev Immunol.* 13(2-4):143-57, 2006.
- FROHMAN, E.M.; RACKE, M.K.; RAINE, C.S. Multiple sclerosis – the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med,* 354: 942 – 55, 2006.
- FURLAN, R.; VILLA, P.; SENALDI, G.; MARTINO, G. TNF $\alpha$  in experimental diseases of the CNS. *Methods Mol Med.* 98:171-90, 2004.
- HASHIMOTO, Y. “Structural development of biological response modifiers based on thalidomide.” *Bioorg Méd Chem.* 10: 461 – 479, 2002.
- HEN-I, L.; SHI-JYE, C.; WANG, D.; NAN-HSIUNG, F. Pharmacological modulation of TNF production in macrophages. *J Microbiol Immunol Infect.* 37: 8 – 15, 2004.
- ISSAZADEH, S.; LJUNGDAHL, A.; HÖJEBERG, b.; MUSTAFA, M.; OLSSON, T. Cytokine production in the central nervous system of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis: dynamics of mRNA expression for interleukin10, interleukin-12, cytolysin, tumor necrosis factor  $\alpha$  and tumor necrosis factor  $\beta$ . *J. Neuroimmunol.* 61: 205-212, 1995.
- KANEKO S, WANG J, KANEKO M, YIU G, HURRELL JM, CHITNIS T, KHOURY SJ, HE Z. Protecting axonal degeneration by increasing nicotinamide adenine dinucleotide levels in experimental autoimmune encephalomyelitis models. *The journal of neuroscience.* 26(38): 9794-9804,2006.
- LASSMANN, H.; SMITH, K.; WEKERLE, H.; COMPSTON, A. The pathogenesis of multiple -sclerosis: a pandect. Philadelphia: **Churchill-livingstone**; p. 661 – 668, 2005.
- LEADBETTER, E.A.; BOURQUE, C.R.; DEVAUX, B. OLSON, C.D.; SUNSHINE, G.H.; HIRANI, S.; WALLNER, B.P.; SMILEK, D.E.; HAPP, M.P. Experimental autoimmune encephalomyelitis induced with a combination of myelin basic protein and myelin oligodendrocyte glycoprotein is ameliorated by administration of a single myelin basic protein peptide. *J Immunol.* 161(1): 504 -12, 1998.
- MOHAMED, A.; TARHUNI, H.; DUFAN, T.; BENGHUZZI, H.; TUCCI, M. The use of digital technology to assess the severity of the Experimental Allergic Encephalomyelitis (EAE) spinal cord lesion. *Biomed Sci Instrum.* 40:419-23, 2004.
- MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43(2): 109 -142, 1991.
- MOREIRA, M. et al. Esclerose Múltipla – Estudo Descritivo de suas Formas Clínica em 302 Casos. *Arq. Neurop.,* 58 (2-B): 460 – 466, 2000.
- MORESCHI JUNIOR, D.; NIGRO, A.J.T.; BANDEIRA, C.O.P.; SEIDEL, A.C.; TORMENA, E.B. Investigation of the use of regional heparinization during temporary arterial ischemia performed in rabbits. *Acta Cir. Bras.,* 14(2), 1999.
- NIARAGH, E.J.; MIRSHAFIEY, A. Th17, the new player of neuroinflammatory process in multiple sclerosis. *Scandinavian Journal of Immunology.* 74: 1-13, 2011.



OWENS, T & SRIRAM, S. The immunology of multiple sclerosis and its animal, model, experimental allergic encephalomyelitis. **Neurol. Clin.** 13 (1): 51 -73, 1995.

PANITCH, H.S. Investigational drug therapies for treatment of multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*, 2: 66 – 77, 1996).

PAPENFUSS, T.L.; ROGERS, C.J.; GIENAPP, I.; YURRITA, M.; McClain, M.; DAMICO, N.; VALO, J.; SONG, F.; WHITACRE, C.C. Sex differences in experimental autoimmune encephalomyelitis in multiple murine strains. **J Neuroimmunol.** 150(1-2): 59 - 69, 2004.

PÉPIN, C.C.; PARAT, A.; PÉRINO, S. ; LENOIR, C. ; VIDAL, M. ; GALONS, H. ; KARLIK, S. ; PUCCI, B. Preliminary biological evaluations of new thalidomide analogues for multiple sclerosis application. **Bioorganic & Medical Chemistry Letters.** 19: 878-881, 2009.

PONOMAREV ED, MARESZ K, TAN Y, DITTEL BN. CNS-derived interleukin-4 is essential for the regulation of autoimmune inflammation and induces a state of alternative activation in microglial cells. **J Neurosci.**3;27(40):10714-21, 2007.

PUGLIATI, M.; ROSATI, G.; CARTON, H.; RIISE, T.; DRULOVIC, J. et al. The Epidemiology of multiple sclerosis in Europe. *Eur J Neurol.* 13: 700 – 22, 2006.

ROSSMAN, H. Neutralizing antibodies to multiple sclerosis treatment. *J Manag Care Pharm.* 10(3) S12 – S17, 2004.

SAMPAIO, E.P.; SARNO, E.M.; GALILLY, R.; COHN, Z.A.; KAPLAN, G. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor  $\alpha$  production by stimulated human monocytes. **J. Exp. Med.** 173: 699 - 703, 1991.

STÜVE, O.; YOUSSEF, S.; WEBER, M.S.; NESSLER, S.; VON BÜDINGEN, H.C.; HEMMER, B.; PROD'HOMME, T.; SOBEL, R.A.; STEINMAN, L.; ZAMVIL, S.S. Immunomodulatory synergy by combination of atorvastatin and glatiramer acetate in treatment of CNS autoimmunity. *J Clin Invest.* 116(4):1037-44, 2006.

TEO, S.K.; COLBURN, W.A.; TRACEWELL, W.G.; KOOK, K.A.; STIRLING, D.I.; JAWORSKY, M.S.; SCHEFFLER, M.A.; THOMAS, S.D.; LASKIN, O.L. Clinical pharmacokinetics of thalidomide. **Clin Pharmacokinet.** 43(5): 311 - 27, 2004.

TILBERY, C. P. **Esclerose Múltipla no Brasil: aspectos clínicos e terapêuticos.** São Paulo: Atheneu, 2005.

YANYING, Z.; BINGJIE, G.; XIAOHUI, J.; XINSHENG, D.; CHUNJIE, S.; FEICHI, W. Sinomenine, an antirheumatic alkaloid, ameliorates clinical signs of disease in the Lewis rat model of acute Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **Biol. Pharm. Bull.** 30(8): 1438 – 1444, 2007