

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS – UFMG
Instituto de Ciências Biológicas – ICB
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia
Departamento de Fisiologia e Biofísica – Núcleo de Neurociências (NNC)

Danielle Bernardes

**Efeitos do exercício físico regular de natação sobre desenvolvimento e
progressão da Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE)**

Tese submetida ao Curso de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia
do Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Minas Gerais, como
requisito parcial à obtenção do grau de Doutor.
Área de concentração: Fisiologia.

Orientadora: Profª. Drª. Juliana Carvalho
Tavares.

Co-Orientador: Prof. Dr. John Roland Bethea
(Miami Project To Cure Paralysis - University
of Miami)

Belo Horizonte - MG
2013

Bernardes, Danielle.

Efeitos do exercício físico regular de natação sobre desenvolvimento e progressão da Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE). [manuscrito] / Danielle Bernardes. – 2013.

155 f. : Il.; 29,5 cm.

Orientadora: Juliana Carvalho Tavares. Co-orientador: John Roland Bethea.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Natação - Aspectos fisiológicos – Teses. 2. Neurofisiologia – Teses. 3. Fisiologia - Teses. 4. Encefalomielite auto-imune experimental. 5. Neuroinflamação. 6. Desmielinização. I. Tavares, Juliana Carvalho. II. Bethea, John Roland. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612.8

**Efeitos do exercício físico regular de natação sobre desenvolvimento e
progressão da Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE)**

Danielle Bernardes

Tese de doutorado defendida e aprovada no dia 02 de setembro de 2013, pela banca
examinadora constituída pelos seguintes professores:

Prof. Dr. Alexandre L. R. de Oliveira

Laboratório de Regeneração Nervosa – Instituto de Biologia - UNICAMP

Prof. Dr. Marco Túlio de Mello

Departamento de Psicobiologia – Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP

Prof. Dr. Antônio Lúcio Teixeira Júnior

Faculdade de Medicina, Departamento de Clínica Médica - UFMG

Prof. Dr.ª. Danusa Dias Soares

Laboratório de Fisiologia do Exercício Escola de Educação Física- EEFFTO-UFMG

Prof. Dr.ª. Juliana Carvalho Tavares

ICB/UFMG, Orientadora

:

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

Belo Horizonte, 02 de setembro de 2013.

APOIO FINANCEIRO

CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; Bolsa de doutorado - Processos 143160/2009-5 e 140647/2013-9)

PDSE-CAPES (Programa Institucional de Bolsas de Doutorado Sanduíche no Exterior - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior; Bolsa de doutorado sanduíche - Processo BEX 0020/12-5)

FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais; Suporte Financeiro - Processo CBB-APQ-01459-10)

Pró-Reitoria de Pesquisa da UFMG - PRPq/UFMG

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia –
ICB/UFMG

National Institutes of Health (NS051709, NS065479) e the Miami Project To Cure Paralysis

RESUMO

A encefalomielite autoimune experimental (EAE) é o modelo para o estudo da Esclerose Múltipla (EM), sendo caracterizado por alterações histopatológicas que incluem inflamação, desmielinização e dano axonal. Por outro lado, o exercício físico regular é reconhecido por seus efeitos antiinflamatórios e neuroprotetores. Além disso, sugere-se que o exercício físico possa exercer alguns efeitos protetores contra desenvolvimento da caquexia que é uma condição associada ao desenvolvimento da apresentação clínica do modelo EAE. Entretanto, ainda não é claro na literatura o efeito do exercício físico regular sobre as alterações histopatológicas no sistema nervoso central (SNC) bem como as alterações metabólicas sistêmicas associadas ao modelo EAE. Portanto, as interações entre um programa de exercício físico regular o desenvolvimento bem como a progressão do modelo EAE foram avaliadas no presente estudo. Para isto, camundongos fêmeas C57BL/6 foram divididos em dois grupos: sedentários e exercitados. O exercício foi realizado na modalidade natação, 5 vezes por semana durante 30 minutos. Após 4 semanas do protocolo de exercício, o peptídeo MOG₃₅₋₅₅ foi injetado para indução da EAE em metade dos animais sedentários e metade dos exercitados. O protocolo de exercício continuou até 10 dias após a indução (dpi), completando 6 semanas de exercício regular. As análises foram realizadas início da apresentação clínica (10 dpi), no pico da apresentação clínica (entre 14 e 20 dpi) e no período crônico da doença (42 dpi) e incluíram: avaliação do metabolismo sistêmico, microscopia intravital, histopatologia (inflamação e desmielinização), citometria de fluxo, imunohistoquímica de oligodendrócitos (CC1 e NG2/PDGFR α) e de dano axonal (SMI-32), Elisa (citocinas e fator de crescimento derivado do cérebro - BDNF) e western blot (PLP, MBP e SMI-32). Como principais resultados, observamos diferente escore clínico entre o início e o período crônico de apresentação clínica do EAE entre os animais sedentários e previamente exercitados. No entanto, embora este resultado tenha sido acompanhado de significativa atenuação da perda de massa corporal pelos animais exercitados em comparação aos mantidos sedentários dos grupos EAE, não foram observadas diferenças metabólicas entre esses grupos. Além disso, a atenuação clínica não foi associada com menor infiltrado de células inflamatórias no pico da doença, mas com níveis alterados de citocinas e BDNF. Neste sentido, enquanto as citocinas foram diminuídas no cérebro e aumentadas na medula espinhal dos animais EAE exercitados em relação aos sedentários, a concentração de BDNF foi elevada nos dois compartimentos no pico da doença. Os animais exercitados apresentaram ainda redução de infiltrado de células CD4, CD8 e células B, de desmielinização e de dano axonal na medula espinhal aos 42 dpi em relação aos mantidos sedentários. Estes resultados corroboram as controvérsias apontadas na literatura entre neuroinflamação e neuroproteção com respostas específicas em cada compartimento do SNC analisadas neste estudo, ou seja, cérebro e medula espinhal. No entanto, este é o primeiro trabalho a mostrar tais interações em decorrência de um programa de exercício físico regular. Sugerimos que o exercício regular realizado antes da apresentação clínica possa ter atuado sinergicamente com as respostas moleculares na fase de desenvolvimento clínico e então modificado o curso crônico de alterações histopatológicas associadas ao modelo. Entretanto, estudos adicionais são necessários para melhor entendimento sobre as relações moleculares desses efeitos sinérgicos entre o exercício e as alterações histopatológicas do modelo EAE.

Palavras- chave: encefalomielite autoimune experimental (EAE); exercício de natação; neuroinflamação; desmielinização; dano axonal.

ABSTRACT

The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is the model to study the Multiple Sclerosis (MS) disease and has been characterized by histopathological hallmarks that include inflammation, demyelination and axonal damage. On the other hand, regular physical exercise is recognized for its anti-inflammatory and neuro-protective effects. Besides, it is suggested that regular exercise can have some protective effect against cachexia, which is a condition associated to the EAE model following the clinical presentation of disease. However, it is not clear if exercise has beneficial effects in central nervous system (CNS) or in systemic metabolic alterations of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) mice. Therefore, the interactions between a prior program of regular exercise and the development and progression of EAE model were evaluated in the present study. For that, female C57BL/6 mice were assigned in two groups: untrained and exercise-trained. The swimming exercise was realized 5 days a week by 30 minutes a day. After 4 weeks of physical exercise protocol, the peptide MOG₃₅₋₅₅ was injected and the animals continued exercising until 10 days post-induction, completing 6 weeks of regular exercise. Analyses were made at onset (10 dpi), first peak disease (between 14 and 20 dpi) and at chronic time point of disease (42 dpi) and included: systemic metabolic assessment, intravital microscopy, histopathology (inflammatory infiltrates and demyelination volume), flow cytometry profile of cells, immunohistochemistry for oligodendrocytes (CC1+, NG2+/PDGFR α) and axonal damage (SMI-32+), ELISA (cytokines and brain derived neurotrophic factor – BDNF) and western blot (PLP, MBP and SMI-32). We observed different clinical score from 12 to 42 dpi between prior trained and untrained mice ($P < 0.0001$). Although there was an important attenuation of body weight loss by exercised EAE animals in comparison with the non-exercised ones, the metabolic alterations were not modified. Moreover, in spite of non effect on infiltrated cells, cytokines and BDNF levels were altered in association with clinical score attenuation in exercised EAE-mice. While cytokines were decreased in brain but increased in spinal cord, BDNF was elevated in both compartments in the exercised EAE-group in comparison to the untrained. Also, being physical trained alters specific profile of recruitment of leucocytes (CD4, CD8 and B cells) to the spinal cord and contribute to a lesser demyelization volume and axonal damage at 42 day post induction. These results corroborates the controvert features between neuroinflammation and neuroprotection with singular responses between the two CNS compartments at acute phase of disease. Regular exercise performed before induction acted synergistically with the EAE model and can have some protective effect at chronic time point. However, further studies are necessary to improve the understanding about the molecular outcomes of these synergic effects between prior exercise and pathologic hallmarks of EAE.

Keywords: Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE); Swimming Exercise; Neuroinflammation; Demyelination; Axonal damage.

LISTA DE ABREVIATURAS

µm	Micrometros
ALS	Esclerose lateral amiotrófica
BDNF	Fator de Crescimento Derivado do Cérebro
CD4	Marcador de superfície 4 / Cluster of differentiation 4 (Células CD4)
CD45	Cluster of differentiation 45
CD8	Marcador de superfície 8 / Cluster of differentiation 8 (Células CD8)
CEBIO	Centro de bioterismo
CETEA	Comitê de ética em experimentação animal
CFA	Adjuvante completo de Freund
CNS	Sistema Nervoso Central
dpi	Dias após a indução
EAE	Encefalomielite Autoimune Experimental
E-C	Exercitado controle
EDSS	Expanded Disability Status Scale
E-EAE	Exercitado com Encefalomielite Autoimune Experimental
EM	Esclerose Múltipla
EPM	Erro padrão da média
HE	Hematoxilina e eosina
IGF-1	Fator de crescimento semelhante a insulina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
INF-γ	Interferon gama
LFB	Luxol fast blue
MAG	Glicoproteína Associada à Mielina
MBP	Proteína Básica da Mielina
mm²	Milímetros quadrados
MOG	Glicoproteína Associada ao Oligodendrócito
MS	Multiple Sclerosis
MSIF	Federação Internacional de Esclerose Múltipla
NGF	Fator de crescimento neural
PCR	Proteína C reativa
PLP	Proteolípideo
SB	Substância branca
SC	Substância cinzenta
S-C	Sedentário controle
S-EAE	Sedentário com Encefalomielite Autoimune Experimental
sIL-6r	Receptor solúvel de interleucina 6
SMI-32	Neurofilamento desfosforilado (dano axonal)
TNF	Fator de Necrose Tumoral

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01. Condições de estudo do Experimento "A"	46
Figura 02. Sinais clínicos da encefalomielite autoimune experimental (EAE) em animais sedentários e exercitados do Experimento "A"	50
Figura 03. Peso relativo dos animais controle e EAE, sedentários e exercitados do Experimento "A".	53
Figura 04. Condições de estudo do Experimento "B"	55
Figura 05. Sinais clínicos da encefalomielite autoimune experimental (EAE) em animais sedentários e exercitados do Experimento "B".	57
Figura 06. Peso relativo dos animais EAE sedentários e exercitados do Experimento "B".	59
Figura 07. Resultado de microscopia intravital para análise dos parâmetros de rolamento (A e C) e adesão (B e D) em microvasculatura de cérebro (A e B) e medula espinhal (C e D) em 10 e 14 dpi de animais EAE e controle, sedentários e exercitados.....	74
Figura 08. Adesão de leucócitos expressa por mm^2 em microvasculatura de cérebro (A) e medula espinhal (B) em 10 e 14 dpi de animais EAE e controle, sedentários e exercitados...	75
Figura 09. Resultado de microscopia intravital para análise dos parâmetros de adesão (A) e rolamento (B) em microvasculatura de cérebro e medula espinhal de animais EAE avaliados quanto ao escore clínico.	77
Figura 10. Adesão de leucócitos expressa por mm^2 em microvasculatura de cérebro e medula espinhal de animais EAE avaliados quanto ao escore clínico.....	78
Figura 11. Fotos ilustrativas de cortes de 06 μm corados por HE e obtidos a partir cérebro (A-B) e medula espinhal (C-D) de animais EAE (14 dpi), sedentários e exercitados.....	79
Figura 12. Análise quantitativa por DO dos cortes de 06 μm de medula espinhal corados por HE de animais EAE aos 14 dpi, sedentários e exercitados	80
Figura 13. Contagem de leucócitos circulantes em animais controle e EAE em 10 e 14 dpi, sedentários e exercitados.....	81
Figura 14. Resultado dos níveis de TNF (A), IL-6 (B), IL-1 β (C) e IL-10 (D) em homogenato de cérebro de animais sedentários e exercitados, controle e EAE (10 e 14 dpi). 85	
Figura 15. Resultado dos níveis de TNF (A), IL-6 (B), IL-1 β (C) e IL-10 (D) em homogenato de medula espinhal de animais sedentários e exercitados, controle e EAE (10 e 14 dpi).	87

Figura 16. Resultado dos níveis de BDNF em homogenato de cérebro e medula espinhal de animais sedentários e exercitados, controle e EAE (10 e 14 dpi).....	88
Figura 17. Contagem total de células em suspensão preparada a partir de homogenato de medula espinhal de animais EAE sedentários e exercitados estudados em 21 e 42 dpi.....	95
Figura 18. Perfil percentual de células recrutadas para a medula espinhal de animais EAE sedentários e exercitados e analisados aos 21 dpi.....	97
Figura 19. Perfil percentual de células recrutadas para a medula espinhal de animais EAE sedentários e exercitados e analisados aos 42 dpi.....	97
Figura 20. Valores absolutos do perfil de células recrutadas para a medula espinhal de animais EAE sedentários e exercitados e analisados aos 21 dpi.	98
Figura 21. Valores absolutos do perfil de células recrutadas para a medula espinhal de animais EAE sedentários e exercitados e analisados aos 42 dpi.	98
Figura 22. Representação do aumento gradativo no volume de desmielinização (LFB) em medula espinhal de animais EAE sedentários e exercitados, entre a fase aguda (14 dpi) e crônica da doença (42 dpi).	104
Figura 23. Análise quantitativa por princípios de Cavalieri dos cortes de medula espinhal corados por LFB de animais EAE sedentários e exercitados em 14 e 42 dpi.....	104
Figura 24. Fotos ilustrativas de cortes de medula espinhal obtidos de animais EAE em 42 dpi e marcados para anticorpos anti-NG2 e anti-PDGFR α	105
Figura 25. Análise quantitativa de células marcadas para PDGFR α , NG2 e com dupla marcação (Double) em substância branca (A), cinzenta (B) e ambas (C) de cortes de medula espinhal de animais EAE aos 42 dpi previamente sedentários e exercitados	105
Figura 26. Foto ilustrativa de corte de medula espinhal obtidos de animais EAE em 42 dpi e marcados para anticorpos anti-CC1	106
Figura 27. Análise quantitativa de células marcadas para CC1 em substância branca (SC) e cinzenta (SC) de cortes de medula espinhal de animais EAE aos 42 dpi	106
Figura 28. Níveis de PLP em homogenato de medula espinhal de animais EAE sedentários e exercitados analisados aos 20 e 43 dpi.....	107
Figura 29. Níveis de MBP em homogenato de medula espinhal de animais EAE sedentários e exercitados analisados aos 20 e 43 dpi	108
Figura 30. Caracterização do dano axonal (marcação com SMI-32) em cortes de medula espinhal de animais EAE sedentários e exercitados em 14 e 42 dpi,	111
Figura 31. Níveis de SMI-32 em homogenato de medula espinhal de animais EAE sedentários e exercitados analisados aos 20 e 43 dpi.....	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Resumo dos resultados observados em estudos sobre os efeitos de uma sessão de exercício (agudo) e do exercício regular (crônico) sobre as concentrações séricas de citocinas e fatores neurotróficos em pacientes portadores de Esclerose Múltipla 33

Tabela 02 – Resumo dos resultados observados em estudos sobre os efeitos de uma sessão de exercício (agudo) e do exercício regular (crônico) em pacientes com Esclerose Múltipla quando comparados com indivíduos saudáveis..... 35

Tabela 03 – Parâmetros clínicos da EAE em animais sedentários e exercitados avaliados até o pico da doença (14 dpi) no experimento “A”. Os dados estão apresentados como média e erro padrão da média (\pm), sendo o valor mediano apresentado entre parênteses 51

Tabela 04 – Parâmetros clínicos da EAE dos animais exercitados no experimento “A” e testados para correlação com a intensidade da carga de treinamento imposta durante o protocolo de exercício regular, realizado antes da indução e mantido até o início do desenvolvimento clínico..... 51

Tabela 05 – Parâmetros clínicos da EAE em animais sedentários e exercitados avaliados até o a fase crônica da EAE em 42 dpi no experimento “B”. Os dados estão apresentados como média e erro padrão da média (\pm), sendo o valor mediano apresentado entre parênteses 58

Tabela 06 – Parâmetros metabólicos dos animais EAE e controles sedentários e exercitados avaliados no pico da doença (14 dpi). Os dados estão apresentados como média e erro padrão da média (\pm) 66

Tabela 07 – Porcentagem e número total de células marcadas para CD45 em diferentes tempos (21 e 42 dpi), dos animais EAE sedentários e exercitados. Os dados estão apresentados como média e erro padrão da média (\pm) 96

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	15
REVISÃO DA LITERATURA.....	19
1. A Esclerose Múltipla (EM)	20
2. O modelo de encefalomielite autoimune experimental (EAE)	25
3. O Exercício Físico e a Esclerose Múltipla	29
4. Exercícios na água e a Esclerose Múltipla	37
5. A Natação como paradigma de exercício físico em modelos animais	38
OBJETIVOS DO ESTUDO.....	40
1. Objetivo geral	41
2. Objetivos específicos.....	41
CAPÍTULO I - Os efeitos do exercício físico regular de natação sobre a apresentação clínica da EAE.....	44
1. Considerações iniciais sobre a aprovação ética dos estudos	45
2. Experimento "A" – NNC/UFGM	45
2.1. Animais e condições experimentais para realização do estudo	45
2.2. O protocolo de exercício físico	46
2.3. O protocolo de indução e a avaliação clínica da EAE	48
2.4. Resultados observados no Experimento "A"	50
3. Experimento "B" – <i>University of Miami</i>	54
3.1. Animais e condições experimentais para realização do estudo	54
3.2. O protocolo de exercício físico utilizado no estudo.....	54
3.3. O protocolo de indução e a avaliação clínica da EAE	56
3.4. Resultados observados no Experimento "B"	57
CAPÍTULO II – Estudo dos parâmetros metabólicos em camundongos exercitados e induzidos para a EAE.....	60
1. Considerações iniciais	61
2. Materiais e métodos	62
3. Resultados Observados.....	64

CAPÍTULO III – Estudo dos efeitos do exercício físico regular sobre os parâmetros associados ao desenvolvimento da EAE	67
1. Recrutamento de leucócitos para o sistema nervoso central	68
1.1. Considerações iniciais	68
1.2. Materiais e métodos	69
1.3. Resultados Observados.....	73
2. Níveis de citocinas (TNF, IL-1 β , IL-6 e IL-10) e do Fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) em homogenato de cérebro e medula espinhal	81
2.1. Considerações iniciais	81
2.2. Materiais e métodos	82
2.3. Resultados Observados.....	84
 CAPÍTULO IV – Estudo dos efeitos do exercício físico regular sobre os parâmetros associados à progressão da EAE.....	89
Considerações iniciais sobre o capítulo	90
1. Perfil do recrutamento leucocitário na medula espinhal	91
1.1. Considerações iniciais	91
1.2. Materiais e métodos	92
1.3. Resultados Observados.....	94
2. Análise dos fatores associados à desmielinização na medula espinhal	99
2.1. Considerações iniciais	99
2.2. Materiais e métodos	99
2.3. Resultados Observados.....	103
3. Análise dos fatores associados ao dano axonal na medula espinhal	108
3.1. Considerações iniciais	108
3.2. Materiais e métodos	109
3.3. Resultados Observados.....	110
 DISCUSSÃO GERAL DO ESTUDO	113
 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	136
 REFERÊNCIAS.....	138

INTRODUÇÃO

A Esclerose Múltipla (EM) é a doença desmielinizante do Sistema Nervoso Central (SNC) mais freqüente no mundo, acometendo aproximadamente dois milhões de pessoas segundo dados da Federação Internacional de Esclerose Múltipla¹.

De modo generalizado, a EM é uma doença auto-imune caracterizada pela presença de infiltrado inflamatório no SNC que pode ser associado de maneira proximal ou remota à degradação da mielina e ao dano axonal (Popescu e Lucchinetti, 2012). É importante notar que a habilidade dual da resposta inflamatória em exacerbar mecanismos relacionados ao dano oligodendroglial e neural por um lado e ativar mecanismos relacionados ao reparo tecidual por outro contribui para o desdobramento de respostas conflitantes (Barbizan e Oliveira, 2010; De Santi, Polimeni *et al.*, 2011; Luhder, Gold *et al.*, 2013). No entanto, é inquestionável o efeito dos déficits neurológicos advindos da progressão da EM causando impacto negativo na qualidade de vida dos pacientes (Sung, Chiu *et al.*, 2013).

O conceito de qualidade de vida relacionada à saúde enfocando progresso funcional e redução da incapacidade tem se tornado tema essencial em estudos sobre a EM, uma vez que são importantes elementos no prognóstico de morbidade e mortalidade.

Em contrapartida, foi recentemente demonstrado que o efeito da incapacidade funcional sobre a qualidade de vida na EM pode ser parcialmente mediado pelos níveis de estresse e quantidade de exercício físico realizado (Sung, Chiu *et al.*, 2013). Verificou-se ainda que o exercício físico regular realizado sob supervisão profissional tem eficácia comparável aos medicamentos usados no controle da progressão da EM sobre a debilidade da marcha (Snook e Motl, 2009). Se o exercício físico exerce efeitos diretos sobre os danos causados pela doença *per se* ou se seus efeitos são indiretamente associados à inatividade física ocasionada pela EM é o debate em questão (Dalgas e Stenager, 2012).

¹ Disponível em: <<http://www.msif.org/about-ms/what-is-ms-1.aspx>> Acesso em 06 agosto 2013.

Na medida em que esse questionamento limita o entendimento sobre os mecanismos dos efeitos relacionados ao exercício físico na EM, aumentam a importância da obtenção de dados experimentais relacionados com a gênese e a evolução das alterações inflamatórias, mielínicas e axonais como elementos implicados nos aspectos da resposta terapêutica. Nesse sentido, o exame cuidadoso dos aspectos da EM nos modelos experimentais tem ajudado a compreender alguns dos mecanismos da doença. Na encefalomielite autoimune experimental (EAE), as alterações clínicas e histopatológicas da EM podem ser reproduzidas mediante imunização de animais com mielina ou seus componentes (Gold, Linington *et al.*, 2006).

Dados prévios da literatura mostraram que o protocolo de exercício físico realizado inteiramente antes da indução do modelo de EAE parece não surtir efeito na apresentação clínica da doença, uma vez que ambos os grupos exercitado e não-exercitado não apresentaram diferenças entre si quanto ao escore clínico observado (Le Page, Bourdoulous *et al.*, 1996; Patel e White, 2013). Se o exercício é iniciado após a indução, os animais exercitados apresentam escore clínico atenuado (Rossi, Furlan *et al.*, 2009) ou atrasado (Le Page, Ferry *et al.*, 1994; Le Page, Bourdoulous *et al.*, 1996) quando comparados com os animais não exercitados.

Se esses efeitos benéficos do exercício físico na apresentação clínica da EAE são resultado do exercício *per se* ou se esses efeitos são indiretamente associados ao estresse que acompanha o exercício é outra questão em debate. Por outro lado, exercício físico forçado e regular realizado por mais de três semanas em camundongos tem a habilidade de promover adaptação corporal ao estresse (Sigwalt, Budde *et al.*, 2011).

Tendo em vista estes argumentos, no presente estudo, propomos um protocolo regular de exercício físico administrado por pelo menos três semanas antes da indução e mantido até antes do desenvolvimento da EAE como estratégia para se investigar as

interações entre exercício físico prévio e as respostas neuroimunomodulatórias associadas ao modelo.

Uma importante e inovadora característica do presente estudo é a busca de um acoplamento neurovascular *in vivo* no modelo de EAE em animais sedentários e exercitados em relação aos mecanismos moleculares e celulares envolvidos na patogênese e com a progressão clínica da doença. Nenhum trabalho, até o momento, avaliou de forma integrativa como a resposta inflamatória (recrutamento de leucócitos e produção de citocinas) pode interferir na patogênese e conseqüentemente na capacidade funcional neurológica em animais exercitados e que apresentam EAE.

Sugerimos que os resultados provenientes deste estudo possam contribuir para a elucidação de possíveis marcadores biológicos associados aos mecanismos envolvidos nos efeitos protetores do exercício físico e para a determinação de novos procedimentos terapêuticos na Esclerose Múltipla.

REVISÃO DA LITERATURA

1. A Esclerose Múltipla (EM)

Epidemiologia é essencialmente o estudo de uma doença, analisando padrões, causas e efeitos e identificando os fatores que podem estar relacionados ao risco de desenvolvimento da mesma. Estudos epidemiológicos sobre a EM sugerem aumento nas suas taxas de incidência que mostram os números de novos casos para cada 100 mil habitantes a cada ano assim como em suas taxas de prevalência que se referem ao número total de casos em cada 100 mil habitantes (Wallin, Culpepper *et al.*, 2012).

Dados da Federação Internacional da Esclerose Múltipla (*Multiple Sclerosis International Federation*, MSIF), apontam cerca de 30.000 casos de EM no Brasil¹, sendo que estudos de prevalência registraram de 15-18 casos por 100 mil habitantes em cidades como Santos, São Paulo e Belo Horizonte (Callegaro, Goldbaum *et al.*, 2001; Lana-Peixoto, Frota *et al.*, 2002; Fragoso e Peres, 2007).

A MSIF desenvolveu um banco de dados contendo informações epidemiológicas sobre a EM que foram disponibilizadas em 2008 sob o título *Atlas: Multiple Sclerosis Resources in the World 2008*², com informações de 112 países. Atualmente, os cinco países com maiores números totais de portadores de EM no mundo são Estados Unidos da América (400.000), Rússia (250.000), Alemanha (122.000), Reino Unido (85.000) e França (80.000).

Por outro lado, o Canadá possui a maior prevalência mundial de EM com 240 casos por 100 mil habitantes. Em seguida, Hungria, Eslovênia e Alemanha com mais de 150 casos, seguidos por EUA, República Checa, Noruega, Dinamarca, Polônia, Reino Unido, Suíça, Chipre e Islândia que contém entre 110-135 casos por 100 mil habitantes. Com relação à

² Disponível em: <<http://www.atlasofms.org/>> Acesso em 06 agosto 2013.

incidência, a Islândia apresenta atualmente a maior taxa com 10 casos para cada 100 mil habitantes a cada ano, seguida por Hungria (9,82), Costa Rica (7,5), Reino Unido (6,0), Lituânia (6,0), Dinamarca (5,9) e Noruega (5,5). Esses dados de certa forma ainda corroboram os apresentados a partir de estudos levantados no século passado, no qual as maiores prevalências foram registradas em países do norte da Europa e das Américas (Rosati, 2001).

Tradicionalmente, tem sido aceito que ter histórico familiar de EM, ser da raça caucasiana, residir em clima temperado, ter contato prévio com alguns tipos de vírus e ser adulto jovem do sexo feminino são fatores que aumentam a *suscetibilidade* a esta doença (Al-Omaishi, Bashir *et al.*, 1999; Noseworthy, 1999; Hemmer, Archelos *et al.*, 2002; Mcqualter e Bernard, 2007). No entanto, apesar dos estudos recentes confirmarem alguns desses conceitos, outros estão sendo substancialmente modificados.

Por exemplo, para se determinar se a incidência de EM varia de acordo com a etnia, um estudo de coorte foi realizado com os membros da comunidade *Kaiser Permanente Southern California* entre 2008 e 2010. Foram observados 496 pacientes com média de idade de 41,6 anos e cerca de 70% deles eram mulheres. Mas a incidência foi maior entre a população negra (10,2) e menor das populações hispânicas (2,9) e asiáticas (1,4), levando à negação da asserção generalizada de que os indivíduos negros possuem menores taxas de EM (Langer-Gould, Brara *et al.*, 2013).

Uma série de três estudos analisou incidência de EM entre veteranos do exército americano da Segunda Guerra Mundial e da Guerra da Coreia (entre 1942 e 1951), da Guerra do Vietnã (entre 1960 e 1994) e da Guerra do Golfo (entre 1990 e 2007) (Wallin, Culpepper *et al.*, 2012). Estes estudos mostraram importantes resultados sobre aumento da incidência e da razão mulheres/homens com o passar das décadas apesar da diminuição do gradiente latitudinal (Confavreux, 2012). Um dado curioso foi observado com os veteranos da Guerra do Golfo em que as taxas de incidência foram similares para forças aéreas e exército, mas

diminuíram gradativamente entre os veteranos da marinha, passando pela guarda costeira e atingindo valores significativamente mais baixos para o corpo de fuzileiros navais (Wallin, Culpepper *et al.*, 2012).

Estas informações nos sugerem que as interações entre fatores genéticos e ambientais são complexas e devem ser objeto de muitos estudos a fim de se elucidar alguns pontos relacionados à epidemiologia e também à etiologia da EM. Aliás, muito se discute sobre os fatores desencadeadores da EM e mesmo sobre sua apresentação clínica diferenciada.

O que se sabe hoje é que o curso da EM é imprevisível, sendo que algumas pessoas podem sentir e parecer saudáveis por muitos anos após o diagnóstico, enquanto outras podem ser gravemente debilitadas muito rapidamente. Isso porque, embora a maioria dos pacientes (80-90%) apresente a doença na forma surto-remissão em que ocorrem crises seguidas de recuperação completa ou parcial entre os surtos, outros pacientes apresentam a forma primariamente progressiva com deterioração gradual e contínua (Hemmer, Archelos *et al.*, 2002; Mcqualter e Bernard, 2007). É importante observar que mesmo na forma surto-remissão a progressão da doença leva a danos neurológicos persistentes, evoluindo para a forma secundariamente progressiva (Gold, Linington *et al.*, 2006).

Além disso, a EM caracteriza-se por ser uma doença variável, pois os sintomas modificam de acordo com a área do SNC afetada e, por essa razão, não existe um padrão definido de apresentação clínica³. Os sintomas também variam ao longo do tempo e podem mudar em termos de gravidade e duração num mesmo indivíduo. Os principais sintomas incluem fadiga; dor; problemas de equilíbrio e movimento; disfunção urinária e intestinal; problemas visuais e alterações de humor e cognição¹. Outros sintomas ainda compreendem distúrbios do sistema cardiovascular, problemas respiratórios, disfunção sexual e disfagia (Bagnato, Centonze *et al.*, 2011).

³ Disponível em: < <http://www.msif.org/about-ms/symptoms/> > Acesso em 06 agosto 2013.

A fadiga caracteriza-se por ser uma sensação de cansaço ou exaustão tanto mental quanto física, afetando cerca de 50% dos pacientes e sendo relatada como um dos distúrbios mais frequentes EM (Leocani, Colombo *et al.*, 2008). A dor também é uma queixa frequente, ocorrendo em aproximadamente 23% dos pacientes e interferindo de forma significativa nas atividades diárias (Bagnato, Centonze *et al.*, 2011). E um dos sintomas mais limitantes na vida dos pacientes com EM é a debilidade da marcha (Motl, Goldman *et al.*, 2010).

O *Expanded Disability Status Scale* (EDSS) é a medida mais comumente utilizada em pesquisas clínicas (Confavreux, 2012) para avaliar, sobretudo, a qualidade da marcha. Acredita-se que 50% das pessoas com EM irá atingir os dois pontos de referência do comprometimento dentro de 10-20 anos de início da doença. Estes dois pontos incluem o escore 4, em que a marcha é limitada, mas o indivíduo é capaz de andar mais de 500 metros sem auxílio e escore 6, em que para caminhar cerca de 100 metros, necessita-se de apoio (Motl, Goldman *et al.*, 2010). O fundamento dessa debilidade está, obviamente, associado com a lesão neurológica da doença *per se* e, portanto, progride com a doença. Mas a falta de condicionamento que também progride à medida que o paciente torna-se cada vez mais sedentário tem sido fator que somatório a esse quadro.

Assim, segundo a MSIF, na gestão eficaz dos sintomas é muitas vezes necessária uma combinação de tratamentos medicamentosos e terapias físicas com adaptações de estilo de vida⁴. É fato, no entanto, que para a eficácia destes tratamentos, cada vez mais conhecimento sobre a gênese e a evolução da doença é necessário.

Várias evidências indicam o caráter auto-imune da doença, que seria mediada por células reativas a um ou mais antígenos presentes na mielina entre eles a proteína básica da mielina – MBP, o proteolipídeo – PLP ou a glicoproteína da mielina associada à

⁴ Disponível em: < <http://www.msif.org/about-ms/symptoms/introduction-to-symptoms.aspx> > Acesso em 06 agosto 2013

oligodendrócitos – MOG (Hemmer, Archelos *et al.*, 2002). Observou-se que os pacientes portadores de EM apresentam, disseminados em seu SNC, extenso infiltrado inflamatório, sobretudo células T CD4, CD8, células B e macrófagos que levariam à degradação da mielina por reconhecimento antigênico dos componentes protéicos mencionados (Popescu e Lucchinetti, 2012). Sendo assim, os marcadores histopatológicos da EM incluem a presença de infiltrado inflamatório multifocais no SNC associado à desmielinização (Zipp e Aktas, 2006). Essa desmielinização pode estar associada à perda ou não de oligodendrócitos (Lucchinetti, Bruck *et al.*, 1996) e tem se observado também ativação de astrócitos e micróglia (Mcqualter e Bernard, 2007).

Acreditava-se que os neurônios eram poupados no decorrer do desenvolvimento da EM e as pesquisas terapêuticas direcionavam seus esforços na limitação das respostas inflamatórias para atenuar a desmielinização. Uma vez que essa terapêutica permanece insatisfatória, a progressão da doença continua sendo um grande desafio e a necessidade de se monitorar o dano axonal nesses pacientes uma crescente (Trapp, Peterson *et al.*, 1998). Atualmente, acredita-se que novas terapêuticas direcionadas objetivando neuroproteção ou, pelo menos, combinando imunomodulação e neuroproteção são urgentemente necessárias (Luhder, Gold *et al.*, 2013).

Uma vez que o dano axonal foi observado em lesões ativas e crônicas de pacientes com EM com duração de doença entre 2 semanas e 27 anos, sugere-se que tratamentos neuroprotetores deveriam ser considerados já a partir do aparecimento dos primeiros sintomas (Trapp, Peterson *et al.*, 1998). Além disso, recente revisão da literatura sugere que os efeitos dos neuroprotetores necessitam ser estudados em modelos animais, investigando a funcionalidade dos mesmos, sobretudo com relação à desmielinização e dano axonal (Luhder, Gold *et al.*, 2013).

2. O modelo de encefalomielite autoimune experimental (EAE)

A história da EAE iniciou-se no Instituto Pasteur em 1885 e teve sua origem vinculada à história da vacina contra a raiva. Emulsões provenientes de medula espinhal de coelhos previamente inoculados com o vírus da raiva foram usadas com sucesso no tratamento dessa infecção em mais de cinco mil pessoas. No entanto, a necessidade de intensificação do tratamento com injeções cada vez mais virulentas levou ao aparecimento de casos de paresia e paralisia. Em situações extremas, os sintomas ascendiam para região dos membros superiores e pescoço afetando deglutição e respiração o que resultou na morte de cerca de 30% das pessoas vacinadas. Quando analisados *post-mortem*, os tecidos mostraram infiltrados linfóides e desmielinização ao redor dos vasos sanguíneos no SNC (Baxter, 2007).

Em 1933, Thomas M. Rivers observou que alguns macacos recebendo injeções de extratos de cérebros de coelhos que não haviam sido previamente inoculados com o vírus da raiva (usados como controle), desenvolveram paresia e fraqueza, e as análises histológicas revelaram infiltrados linfóides e desmielinização. Nos experimentos com coelhos, Rivers observou que quanto mais antigênica a emulsão, maior era a resposta humoral e maior o número de coelhos afetados, sugerindo uma resposta imune específica (Van Epps, 2005).

Em 1946, Elvin A. Kabat (*Columbia University*) e Isabel M. Morgan (*Johns Hopkins University*), foram capazes de padronizar um método de impulsionar a produção dos anticorpos contra mielina ao se misturar os extratos cerebrais com *Mycobacterium tuberculosis* e óleo de parafina, o conhecido adjuvante de Freund (Kabat, Wolf *et al.*, 1947; Morgan, 1947). O benefício dessa estratégia foi o de diminuir cada vez mais o número de injeções necessárias para a indução do modelo.

Mas Kabat foi provavelmente o primeiro pesquisador a notar as similaridades entre a encefalomielite experimental e a EM. Assim, apresentava-se ao mundo científico uma encefalomielite que poderia ser induzida em várias espécies de animais. Este modelo resultava em um quadro surto-remissivo de acometimentos neurológicos e mostrava, nas análises histológicas, infiltrados leucocitários com hipertrofia e proliferação de células microgliais (Van Epps, 2005; Baxter, 2007).

Embora estivesse claro que muitos constituintes do SNC pudessem induzir a EAE, a atenção foi rapidamente concentrada nos antígenos associados à mielina, uma vez que a desmielinização era um fator importante da doença. E, de fato, a purificação da mielina foi verificada como sendo cinco vezes mais encefalitogênica na década de 1960. Mais tarde, nos anos 70, se observou que a remoção dos lipídeos da mielina com utilização de clorofórmio e metanol, resultava em uma preparação relativamente homogênea de proteína básica da mielina (*Myelin Basic Protein*, MBP) que era ainda mais efetiva. Essa proteína passou então a ser isolada e utilizada como principal antígeno no modelo (Baxter, 2007).

A essa mesma época, levantou-se a hipótese de que polímeros aleatórios com composição de aminoácidos semelhante ao dos encefalitogênicos também eram capazes de induzir a doença. Com a finalidade de testar essa hipótese, em 1971, surgiu o acetato de glatirâmer, uma mistura de polipeptídeos contendo alanina, ácido glutâmico, lisina e tirosina, que na verdade, mostrou-se protetor contra o desenvolvimento da EAE (Racke, Lovett-Racke *et al.*, 2010). A partir de então, os estudos com esse modelo a fim de se entender a patogênese da EM e identificar possíveis tratamentos para a mesma se intensificaram substancialmente.

Apesar do ceticismo e a desconfiança associados à utilização do modelo, hoje em dia, o EAE é considerado o modelo de doença auto-imune melhor caracterizado. Ele tem auxiliado na identificação e caracterização de aspectos inflamatórios e de dano tecidual e foi o gatilho para o desenvolvimento de importantes fármacos no tratamento da EM (Baxter, 2007).

É importante destacar o fato de que os numerosos modelos de desmielinização refletem a certa variabilidade clínico-patológica da doença em humanos (Berard, Wolak *et al.*, 2010).

Essa variabilidade até certo ponto também embasou grande debate sobre a própria natureza autoimune do modelo. Até os anos 1980, EAE significava encefalomielite alérgica experimental, pois acreditava-se que se tratava simplesmente de uma reação alérgica ligada à hiperreatividade do sistema imune dos animais injetados contra agentes exógenos. Mas esse conceito foi modificado a partir da demonstração de que a transferência adotiva de células T específicas para MBP eram capazes de induzir a EAE em ratos (Gold, Linington *et al.*, 2006). No entanto, embora esse modelo de transferência de células T adotivas tenha sua importância em fornecer ferramenta importante para estudo dos mecanismos envolvidos na patogênese da inflamação no SNC, ele não é um modelo completo de EM. Na verdade, acredita-se que esse modelo seja insuficiente para desencadear desmielinização crônica tanto em ratos quanto em camundongos (Shin, Ahn *et al.*, 2012).

Com a identificação da MOG em oligodendrócitos (1986), grande progresso em reproduzir o curso clínico da EM com relação à desmielinização foi atingido (Lebar, Lubetzki *et al.*, 1986). Apesar das proteínas PLP e MBP serem as mais abundantes no SNC, as proteínas de menor concentração como MAG (glicoproteína associada à mielina) e MOG são importantes em mediar as interações glia-gliais e neuronal-gliais (Pham-Dinh, Mattei *et al.*, 1993). No entanto, enquanto a MAG pode ser observada tanto no sistema nervoso central como periférico, a MOG é exclusiva do central. Estes autores demonstraram ainda que a MOG localiza-se mais externamente na bainha de mielina e é expressa mais tardiamente durante o desenvolvimento cerebral em relação a outras proteínas da mielina, sugerindo seu papel mais específico em estágios finais de mielinização.

Assim, a injeção do fragmento de 21 aminoácidos MOG₃₅₋₅₅ em roedores é, atualmente, um dos modelos de EAE mais utilizados (Pham-Dinh, Mattei *et al.*, 1993;

Breithaupt, Schubart *et al.*, 2003). Esse modelo foi inicialmente descrito em ratos Lewis (Linington, Bradl *et al.*, 1988) sendo caracterizada por processos fisiopatológicos similares ao da EM incluindo células T encefalitogênicas (Linington, Berger *et al.*, 1993). Posteriormente, foi padronizada injeção desse peptídeo em camundongos C57BL/6, nos quais se verificou ativação de células T que acessam o SNC e estimulam a produção de citocinas e moléculas de adesão, facilitando o tráfego de células mononucleares através do endotélio (Juedes, Hjelmstrom *et al.*, 2000).

Nosso grupo investigou o componente inflamatório na EAE induzida por MOG₃₅₋₅₅ em camundongos C57BL/6 e demonstrou aumento de leucócitos rolando e aderidos em microvasculatura cerebral, infiltrado inflamatório no parênquima cerebral e nas regiões submeningeais medulares, presença de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias em homogenato de cérebro que acompanharam a apresentação clínica da doença (Dos Santos, Barsante *et al.*, 2005; Dos Santos, Roffe *et al.*, 2008).

Além dos parâmetros inflamatórios clássicos da EM, também tem se observado neste modelo fatores associados a desmielinização e ao dano axonal e estas alterações histopatológicas são correlacionadas com a apresentação clínica da doença que evolui de paralisia de cauda para paralisia de membros posteriores até atingir paralisia de membros anteriores (Recks, Addicks *et al.*, 2011). Por outro lado, sugere-se que a presença/ausência de inflamação define o estágio da doença, com as primeiras fases sendo predominantemente inflamatórias e as últimas, predominantemente neurodegenerativas, embora ambos os eventos sejam responsáveis pelo escore clínico e possam ocorrer concomitantemente.

3. O Exercício Físico e a Esclerose Múltipla

Durante muito tempo especulou-se que indivíduos portadores de EM não deveriam praticar exercício físico porque poderia exacerbar a doença e aumentar a sensação de fadiga (Waschbisch, Tallner *et al.*, 2009). Assim, a EM vinha sendo associada à diminuição na realização de atividade física, resultando em um descondicionamento e levando a uma progressão ainda mais acentuada na marcha debilitada (Mottl, Goldman *et al.*, 2010). Diante desse quadro, os pacientes ficavam vulneráveis ao ganho de peso, depressão e menor participação social, resultando em prejuízo adicional na qualidade de vida (Khurana, Bamer *et al.*, 2009; Waschbisch, Tallner *et al.*, 2009).

Por outro lado, nas últimas décadas surgiram várias evidências sobre os efeitos benéficos do exercício físico regular na atenuação desses prejuízos. E uma meta-análise observou que os efeitos do exercício sobre a mobilidade na EM é comparável em magnitude com os efeitos dos medicamentos usados no controle da progressão da doença, sendo estatisticamente significantes quando supervisionados por profissionais capacitados (Snook e Mottl, 2009). No entanto, a natureza transversal dos poucos estudos existentes ainda limitam conclusões que levem a uma relação causal (Dalgas e Stenager, 2012). Além disso, permanece por ser elucidado se o exercício poderia reverter os prejuízos causados pela doença *per se* ou se reverteria simplesmente os danos causados pela inatividade.

Atividade física é classicamente definida como qualquer tipo de atividade que promova movimento corporal e aumento do gasto energético enquanto exercício é um subgrupo de atividade física que é planejado e repetitivo e tem a finalidade de melhorar a aptidão física (Caspersen, Powell *et al.*, 1985). Recomendações de saúde pública estimulam a realização de um programa diário de pelo menos 30 minutos de atividade física em

intensidade moderada, pois se acredita que esta ofereça benefícios substanciais e proteja o organismo contra o desenvolvimento de inúmeras doenças (Blair, Lamonte *et al.*, 2004).

O exercício físico regular é reconhecido por seu papel em aumentar a eficiência energética muscular (Astrand, 1992) e modular respostas endócrinas (De Glisezinski, Crampes *et al.*, 1998), influenciando o metabolismo sistêmico, levando à redução e prevenção no ganho de gordura corporal (Hardman, 1999). Uma vez que o tecido adiposo tem sido reconhecido por seu papel na liberação de moléculas pró-inflamatórias tais como TNF e leptina, o controle da adiposidade pelo exercício tem sido apontado também como um dos seus mecanismos antiinflamatórios (Gleeson, Bishop *et al.*, 2011). Estes efeitos em conjunto parecem promover proteção contra o desenvolvimento da síndrome metabólica que é caracterizada pela presença de obesidade associada à diabetes tipo II e hipertensão, contribuindo para a redução no risco de doenças coronarianas e aumentando a expectativa de vida (Strasser, 2013).

No entanto, apesar deste efeito óbvio no controle da adiposidade, ele não explica todas as vias protetoras do exercício físico regular. Assim, vários estudos têm investido na busca pelo “fator de exercício” que seria aquela *molécula* responsável pelos benefícios observados sendo que uma das mais fortes candidatas é a interleucina-6 (Pedersen, Steensberg *et al.*, 2003).

Durante cada sessão de exercício, ocorre aumento na concentração circulante de IL-6 derivada dos músculos em atividade estimulados pelas alterações no metabolismo de carboidratos, como por exemplo, a redução na concentração intramuscular de glicogênio (Pedersen, Steensberg *et al.*, 2001; Petersen e Pedersen, 2005). Este aumento na concentração circulante de IL-6 ocorre em proporção direta com a duração e a intensidade do exercício e seria um mecanismo para atuar no controle da regulação metabólica do fígado, tecido adiposo e do próprio músculo (Pedersen, Steensberg *et al.*, 2001). Além disso, o aumento de IL-6

circulante é seguido por maior liberação de fatores antiinflamatórios como o receptor solúvel de IL-1 β e a IL-10, sem alteração na concentração circulante das citocinas pró-inflamatórias clássicas, como TNF e IL-1 β (Petersen e Pedersen, 2005). Dessa forma, sugere-se que os efeitos antiinflamatórios de cada sessão de exercício possam proteger contra a inflamação sistêmica crônica de baixo grau associada com a maioria das co-morbididades da síndrome metabólica (Mathur e Pedersen, 2008).

Em verdade, tem sido proposto que o mecanismo do efeito antiinflamatório pode variar de acordo com a frequência, intensidade e duração do exercício realizado. Para o exercício de baixa intensidade, é provável que o controle de gordura corporal seja o mecanismo mais importante. Mas para curtos períodos de exercícios de alta intensidade ou de duração prolongada em intensidade moderada, os demais efeitos antiinflamatórios tais como a modulação de citocinas e aumento na concentração circulante de adrenalina e cortisol podem ter um papel cada vez mais importante (Gleeson, Bishop *et al.*, 2011).

Recentemente foi proposto inclusive que tais alterações metabólicas e inflamatórias proporcionadas pelo exercício físico regular poderiam proteger contra o desenvolvimento de um quadro de inflamação de baixo grau associado à obesidade em pacientes com lesão medular (Da Silva Alves, De Aquino Lemos *et al.*, 2013).

É importante observar que o dano medular é seguido pelo aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias especificamente no local da lesão, levando à liberação de glutamato que ocasiona dano mitocondrial (Basso e Hansen, 2011). Estes autores ainda discutem que tais eventos, em combinação com a diminuição de fatores tróficos, como o BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro), o IGF (fator de crescimento semelhante à insulina) e a neurotrofina-3, resultam em apoptose de neurônios e oligodendrócitos. Assim, uma vez que o exercício regular é capaz de aumentar a produção dos fatores tróficos no

modelo de lesão medular (Hutchinson, Gomez-Pinilla *et al.*, 2004), efeitos específicos sobre plasticidade neural e função sensorial são sugeridos.

Em verdade, somando-se aos conhecidos efeitos metabólico, cardiorrespiratório e antiinflamatório mencionados, os efeitos benéficos do exercício regular para a saúde e função do SNC têm ganhado crescente importância, sendo invariavelmente associados com produção aumentada de fatores neurotróficos (Ang e Gomez-Pinilla, 2007). Dados prévios da literatura mostram que embora uma sessão de exercício aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias e fatores pró-apoptóticos no SNC, o exercício físico regular tem efeitos opostos (Packer, Pervaiz *et al.*, 2010). Acredita-se que estes efeitos se somam, promovendo neuroproteção, o que obviamente aumenta o interesse em se entender os possíveis efeitos do exercício físico regular na EM.

Aliás, uma das linhas que investiga os efeitos do exercício físico sobre a patogênese da EM analisa as concentrações séricas de citocinas e fatores neurotróficos após uma sessão ou um período de exercício regular. Um resumo dos resultados descritos nestes estudos pode ser observado na **Tabela 01**, onde são apresentadas as comparações entre os valores pré e pós período de exercício nos pacientes EM.

Pela observação desta tabela, notamos que as repostas séricas de citocinas e fatores neurotróficos apresentam-se inconclusivas na literatura. Uma sessão de exercício (ciclismo realizado por 30 minutos a 60% do VO_{2peak}) aumentou (Heesen, Gold *et al.*, 2003; Castellano, Patel *et al.*, 2008) ou não teve efeito (Bansi, Bloch *et al.*, 2012) sobre as citocinas. Do mesmo modo, um programa regular de 8 semanas de ciclismo realizados 3 vezes por semana por 30 minutos a 60% do VO_{2peak} não promoveu nenhuma alteração (Heesen, Gold *et al.*, 2003; Schulz, Gold *et al.*, 2004) ou aumentou (Castellano, Patel *et al.*, 2008) os níveis séricos de citocinas pró inflamatórias, notadamente TNF e INF- γ .

Tabela 01 – Resumo dos resultados observados em estudos sobre os efeitos de uma sessão de exercício (agudo) e do exercício regular (crônico) sobre as concentrações séricas de citocinas e fatores neurotróficos em pacientes portadores de Esclerose Múltipla.

Estudo	Protocolo	Citocinas/células		Fatores neurotróficos	
		Agudo	Crônico	Agudo	Crônico
Bansi et al., 2012	52 pacientes			BDNF ↑ (água)	BDNF ↑ (água)
	30min/5 x sem/3 sem				
	28: Ciclismo a	TNF ↔	TNF ↔		
	60%VO _{2peak}	IL-6 ↔	IL-6 ↔	BDNF ↔	BDNF ↔
Waschbisch et al., 2012	24: Ciclismo	sIL-6 r ↔	sIL-6 r ↔	NGF ↔	NGF ↔
	60%VO _{2peak} na água				
	21 pacientes ativos e				
	21 pacientes sedentários (estudo de correlação)	-	Células imunes ↔	-	BDNF ↔
Golzarí et al., 2010	20 pacientes		INF-γ ↓		
	20min/3 x sem/8 sem		IL-17 ↓	-	-
	Aeróbico e resistência		IL-4 ↔		
		IL-6 ↑	IL-6 ↔		
Castellano et al., 2008	11 pacientes treinados (analisados pré e pós treino)	TNF ↔	TNF ↑	-	-
		INF-γ ↔	INF-γ ↑		
	30min/3 x sem/8 sem			BDNF ↔	BDNF ↑↔
	Ciclismo – 60%VO _{2max}	-	-	IGF-1 ↔	IGF-1 ↔
Castellano e White, 2008				BDNF ↔	
				IGF-1 ↔	
				BDNF ↔	
				IGF-1 ↔	
White e Castellano, 2006	10 pacientes treinados 2 x sem/8 sem		IL-4 ↓		
	Treinamento de resistência		IL-10 ↓		
			INF-γ ↓		
			PCR ↓	-	-
Schulz et al., 2004	15 pacientes		TNF ↔		
	Crônico: Ciclismo (60%VO _{2max})	IL-6 ↔	IL-6 ↔	BDNF ↔	BDNF ↔
	30min/3 x sem/8 sem			NGF ↔	NGF ↔
Heesen et al., 2003	Agudo: 30min de ciclismo (60%VO _{2peak})	INF-γ ↑	INF-γ ↔		
		TNF ↑	TNF ↔	-	-
		IL-10 ↑	IL-10 ↔		
Gold et al., 2003	25 pacientes			BDNF ↑	
	30min – ciclismo	-	-	NGF ↔	-
	60%VO _{2peak}				

Legenda: ↔ não se alterou em relação ao valor pré; ↑ concentração aumentada após o período de exercício; ↓ concentração diminuída após o período de exercício.

Uma sessão de ciclismo realizado por 30 minutos a 60% do VO_{2peak} dentro (Bansi, Bloch *et al.*, 2012) ou fora da água (Gold, Schulz *et al.*, 2003) foi capaz de promover aumento sérico de BDNF em pacientes EM estáveis. Do mesmo modo, curtos períodos de exercício regular tiveram efeito similar. Neste caso, tanto o protocolo de 30 minutos de ciclismo na água a 60% do VO_{2peak} realizados 5 vezes por semana durante três semanas (Bansi, Bloch *et al.*, 2012) quanto o protocolo de 30 minutos de ciclismo a 60% do VO_{2peak} realizados 3 vezes por semana durante 4 semanas (Castellano e White, 2008) foram efetivos em aumentar as concentrações séricas de BDNF em pacientes EM estáveis. No entanto, não foram observadas diferenças após períodos mais crônicos de exercício (Schulz, Gold *et al.*, 2004; Castellano e White, 2008; Waschbisch, Wenny *et al.*, 2012). Neste caso, foram observados tanto efeitos negativos de 8 semanas de ciclismo a 60% do VO_{2peak} realizados 3 vezes por semana (Castellano e White, 2008; Schulz, Gold *et al.*, 2004) quanto não diferentes nos valores repouso de pacientes ativos em comparação com não ativos.

Assim, uma questão conflitante fica em aberto com relação à comunicação entre neurotrofinas e fatores do sistema imune e, portanto, investigações adicionais são necessárias para o melhor entendimento da regulação envolvida na neuroproteção de pacientes com EM. Além disso, por questões éticas, estes estudos excluem os pacientes que estejam experimentando um surto e apenas aqueles estáveis na doença são incluídos (Gold, Schulz *et al.*, 2003; Heesen, Gold *et al.*, 2003; Schulz, Gold *et al.*, 2004; Castellano, Patel *et al.*, 2008; Castellano e White, 2008).

O fato é que a maioria das respostas observadas nestes estudos é similar à descrita aos pares saudáveis, sendo que as diferenças observadas estão descritas na **Tabela 02**.

Tabela 02 – Resumo dos resultados observados em estudos sobre os efeitos de uma sessão de exercício (agudo) e do exercício regular (crônico) em pacientes com Esclerose Múltipla quando comparados com indivíduos saudáveis.

Estudo	Citocinas/ Fatores neurotróficos		
	Basal	Agudo	Crônico
Castellano et al., 2008	-	-	↑ TNF
Castellano and White, 2008	↓ BDNF	-	↓ BDNF
Heesen et al., 2003	↓ INF- γ	-	↓ IL-10*
Gold et al., 2003	↑ NGF	↑ NGF	-

* Em comparação com indivíduos saudáveis não exercitados.

Com estes dados, notamos que continua em aberto como a imunomodulação promovida pelo exercício físico regular poderia atuar em pacientes com EM durante o surto da doença. É importante notar que os surtos da EM são descritos como o momento em que a concentração sérica dos fatores neurotróficos está exacerbada (Sarichielli, Greco *et al.*, 2002). Além disso, foi demonstrada uma correlação inversa entre o número de lesões T2 na ressonância magnética por imagem e os níveis séricos de BDNF (Comini-Frota, Rodrigues *et al.*, 2012). Estes dados sugerem que estratégias capazes de promover o aumento na produção de BDNF durante os surtos, poderiam promover um efeito neuroprotetor adicional, uma vez que esta molécula tem sido reconhecida como um mediador importante molecular na neuroproteção (De Santi, Polimeni *et al.*, 2011; Luhder, Gold *et al.*, 2013).

Dois estudos de imagem por ressonância magnética sugeriram efeito protetor da aptidão cardiorrespiratória sobre função e estrutura cerebrais em pacientes com EM (Prakash, Snook *et al.*, 2007; Prakash, Snook *et al.*, 2010). Se estes resultados estão associados à maior

produção de fatores tróficos ou mesmo atenuação de citocinas pro-inflamatórias no SNC dos pacientes com EM, permanece por ser elucidado.

Por outro lado, as interações entre um protocolo de exercício físico regular e a produção de citocinas e fatores neurotróficos bem como sua influência nos parâmetros histopatológicos associadas à doença, podem ser avaliados com a utilização dos modelos animais. Dois estudos do século passado, mostraram que o exercício em esteira atrasou significativamente o aparecimento da EAE quando os ratos correram do dia 0 ao dia 10 pós-indução, até o surgimento da paralisia (Le Page, Ferry *et al.*, 1994). Da mesma forma, dois dias de exercício intenso, realizados após a indução, atrasaram ligeiramente o início da doença sem afetar a sua gravidade (Le Page, Bourdoulous *et al.*, 1996).

Outro estudo mais recente, avaliando os efeitos da corrida voluntária sobre a EAE induzida por MOG₃₅₋₅₅ em camundongos C57BL/6, além de atenuação dos sinais clínicos, também observou restauração da sensibilidade do receptor canabinóide CB1 e da perda de espinhas dendríticas, características comuns no striatum de animais EAE (Rossi, Furlan *et al.*, 2009). Como diferenças inflamatórias na medula espinhal e no cérebro entre os dois grupos analisados não foram observadas, os autores sugeriram que o exercício não tenha atuado na minimização da gravidade clínica via atenuação do processo inflamatório. Neste estudo, a análise histopatológica foi realizada em animais sacrificados em 50 dpi, quando a apresentação clínica da doença apresenta-se em remissão.

Conforme mencionado anteriormente, tem se sugerido que a progressão do modelo EAE induzido por MOG₃₅₋₅₅ em camundongos C57BL6 é associado com aumento nos níveis de desmielinização e dano axonal (Recks, Addicks *et al.*, 2011). Além disso, sugere-se que a necessidade de se estudar os efeitos de estratégias neuroprotetoras em modelos animais tem sido apontada como uma urgência (Luhder, Gold *et al.*, 2013). Dessa forma, o entendimento dos efeitos do exercício físico regular na modulação das respostas características da EM como

inflamação, desmielinização e dano axonal podem ser avaliados pelos resultados apresentados no presente estudo.

4. Exercícios na água e a Esclerose Múltipla

Apesar da inconsistência com relação aos resultados observados, sobretudo em função da falta de controle adequado (Bender, Karagulle *et al.*, 2005), os exercícios na água são frequentemente utilizados objetivando-se alívio da dor em pacientes com alterações neurológicas e musculoesqueléticas (Hall, Swinkels *et al.*, 2008). Além disso, argumenta-se que exercícios de corrida podem ser inadequados para pacientes com EM devido à exposição a condições ambientais adversas, enquanto que a natureza flutuante de água e a capacidade de controle de temperatura da água de forma são características que tornam os exercícios na água uma terapêutica mais positiva (Gehlsen, Grigsby *et al.*, 1984).

Os efeitos de um programa de exercícios aquáticos realizados em intensidade equivalente ao limiar de lactato⁵, duas vezes por semana, durante 8 semanas, foram testados em duas mulheres portadoras de EM (Pariser, Madras *et al.*, 2006). Elas portavam a doença há mais de 10 anos e possuíam deficiência leve (EDSS = 2.5) com sensações de fadiga, dormência nas mãos e nos pés e visão turva ocasional. Após o período de intervenção, as duas mulheres apresentaram aumento da aptidão física representada pelo aumento na carga de trabalho suportada. As respostas sintomatológicas, porém, foram ambíguas com uma participante informando diminuição da sensação de fadiga e outra não relatando mudança.

⁵ Limiar de lactato é a intensidade do exercício na qual a produção de ácido lático pelos músculos em atividade supera a remoção sistêmica desse metabolito durante o exercício físico progressivo (Mcardle, Katch *et al.*, 1998).

Por outro lado, um estudo realizado com mulheres portadoras de EM na forma surto remissão verificou efeitos benéficos dos exercícios aquáticos na diminuição dos sintomas de fadiga. Neste estudo, 10 mulheres fizeram exercícios aquáticos durante 8 semanas, 3 vezes por semana com duração de 60 minutos cada sessão e 11 mulheres serviram como controle. Antes do início do estudo e nos períodos 4 e 8 semanas, as mulheres responderam ao questionário HRQOL (*Health Related Quality of Life*) para indicar sintomas de fadiga. No início do estudo, os dois grupos de mulheres não diferiram entre si quanto ao nível de fadiga, mas nas semanas 4 e 8, o grupo exercitado apresentou melhores resultados que o grupo controle (Kargarfard, Etemadifar *et al.*, 2012).

5. A Natação como paradigma de exercício físico em modelos animais

Exercício de natação tem sido aceito como um modelo bem controlado de treinamento físico em animais. Neste sentido, seis semanas de natação são capazes de melhorar a condição cardiovascular (Evangelista, Brum *et al.*, 2003) e desenvolver resistência muscular (Oh-Ishi, Kizaki *et al.*, 1996) em camundongos.

Com relação à aptidão cardiovascular, verificou-se diminuição da frequência cardíaca de repouso em camundongos exercitados na modalidade natação por seis semanas em 5 diferentes protocolos de exercício incluindo: 1) duas sessões diárias de 90 minutos sem adição de carga; 2) duas sessões diárias de 60 minutos sem adição de carga; 3) uma sessão diária de 90 minutos sem adição de carga; 4) duas sessões diárias de 60 minutos com adição de 2% do peso corporal atado a cauda dos animais e; 5) duas sessões diárias de 60 minutos com adição de 4% do peso corporal. Em todos os casos, os protocolos foram realizados cinco vezes por semana com a temperatura da água mantida entre 30 e 32 °C. Não houve diferenças

entre os grupos e os autores sugeriram que a bradicardia de repouso indica melhor do condicionamento aeróbio nestes animais (Evangelista, Brum *et al.*, 2003).

Animais exercitados em cinco vezes por semana, durante uma hora sem adição de carga em água de 35-36°C mostraram aumento da atividade de citrato sintase em músculo gastrocnêmio após seis semanas de realização (Oh-Ishi, Kizaki *et al.*, 1996).

Dados prévios demonstraram que, se comparado a corrida, a natação parece fornecer uma força motriz mais importante para as adaptações moleculares em favor da neuroproteção (Ra, Kim *et al.*, 2002; Deforges, Branchu *et al.*, 2009).

Neste caso, ao se comparar os efeitos da natação e da corrida em um modelo animal de esclerose lateral amiotrófica (ALS), verificou-se que a natação realizada 30 minutos por dia, 6 vezes por semana durante 45 dias promoveu melhora na função motora, aumento da expectativa de vida em cerca de 25 dias e ao contrário da corrida, a natação retardou significativamente a morte dos neurônios motores espinhais bem como preservou as populações celulares de astrócitos e oligodendrócitos (Deforges, Branchu *et al.*, 2009). A intensidade do exercício foi controlada pela velocidade do fluxo de corrente da água na piscina (5 litros por minuto) e velocidade da esteira na corrida (13 metros por minuto).

Os autores sugeriram que os mecanismos moleculares da neuroproteção induzida pela natação possa não refletir a expressão de moléculas difusíveis, mas uma modificação intrínseca dos neurônios ativados. Assim, nos perguntamos se essas modificações intrínsecas específicas fornecidas por treinamento de natação poderiam ser aplicadas ao modelo de EAE. Vale mencionar que o presente estudo é o primeiro trabalho a investigar os efeitos do exercício regular de natação no desenvolvimento e na progressão da encefalomielite autoimune experimental.

OBJETIVOS DO ESTUDO

1. Objetivo geral

O objetivo geral do estudo foi avaliar os efeitos neurofisiológicos de seis semanas de exercício físico regular na modalidade natação iniciados anteriormente à indução e mantidos até o início do desenvolvimento da encefalomielite autoimune experimental (EAE) sobre o desenvolvimento e progressão da doença.

2. Objetivos específicos

Visando o cumprimento do objetivo geral do estudo este trabalho foi dividido em capítulos I, II, III e IV. Sendo assim, os objetivos específicos de cada capítulo são descritos a seguir:

1 - Capítulo I

Estudar a evolução clínica da EAE em resposta ao exercício físico prévio e regular de natação nos animais EAE sedentários e exercitados, utilizando:

- Observação diária da pontuação do escore clínico;
- Coleta diária de dados de peso corporal dos animais

II – Capítulo II

Estudar alterações metabólicas sistêmicas associadas ao exercício físico regular de natação e possivelmente afetadas pelo modelo EAE na sua fase aguda em animais EAE e controle, sedentários e exercitados, utilizando:

- Mensuração do peso do tecido adiposo branco, do músculo gastrocnêmio e do fígado;
- Mensuração dos níveis séricos de glicose, triglicérides e colesterol;
- Mensuração do conteúdo de glicogênio muscular e hepático;
- Mensuração do conteúdo muscular de TNF e IL-6.

III – Capítulo III

Estudar alterações neuroinflamatórias associadas ao desenvolvimento do EAE e se o exercício físico regular e prévio de natação pode causar alguma modulação destas alterações. Para isto, foram estudados, na fase da aguda da doença, animais EAE e controle, sedentários e exercitados, quanto à:

- Quantificação do recrutamento de leucócitos por microscopia intravital em cérebro e medula espinhal;
- Quantificação da alteração de celularidade por histologia (HE) em cérebro e medula espinhal;
- Contagem total circulante de leucócitos;

- Quantificação dos níveis de citocinas anti- e pró-inflamatórias por Elisa em homogenato de cérebro e medula espinhal;
- Quantificação dos níveis de BDNF por Elisa em homogenato de cérebro e medula espinhal.

IV – Capítulo IV

Estudar alterações neuropatológicas associadas à progressão do modelo EAE e se as mesmas podem ser afetadas pelo exercício físico regular e prévio de natação. Para isto, estudou-se, na fase crônica da doença, medula espinhal de animais EAE sedentários e exercitados, quanto à:

- Análise do perfil de células infiltradas por citometria de fluxo;
- Análise do volume de desmielinização por luxol fast blue;
- Quantificação de oligodendrócitos maduros e células progenitoras de oligodendrócitos por imunohistoquímica;
- Quantificação de proteínas da mielina por western blot;
- Análise qualitativa de dano axonal por imunohistoquímica;
- Quantificação de proteína indicadora do dano axonal por western blot;

**CAPÍTULO I - Os efeitos do exercício físico regular de
natação sobre a apresentação clínica da EAE**

1. Considerações iniciais sobre a aprovação ética dos estudos

Os estudos realizados entre setembro de 2010 e abril de 2012 no Núcleo de Neurociências (NNC) do Departamento de Fisiologia e Biofísica da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) foram aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal (CETEA) da mesma universidade sob protocolo número 24/2010 (página 154). Os estudos realizados sob este protocolo serão coletivamente referidos como experimento “A” neste capítulo, mas também inclui os dados apresentados nos capítulos II e III.

Os estudos realizados entre maio de 2012 e fevereiro de 2013 no *Department of Microbiology and Immunology and Neurological Surgery* da *University of Miami* foram aprovados pelo comitê institucional para usos e cuidados com animais da mesma universidade (*Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Miami*) sob protocolo número 09161. Os estudos realizados sob este protocolo serão coletivamente referidos como experimento “B” neste capítulo, mas também inclui os dados apresentados no capítulo IV.

2. Experimento “A” – NNC/UFMG

2.1. Animais e condições experimentais para realização do estudo

O centro de bioterismo (CEBIO) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) forneceu os 166 camundongos fêmeas C57BL/6J (6-8 semanas de idade) pesando $16,2 \pm 0,12$ gramas (média \pm EPM) que foram utilizados no experimento “A”. Estes animais foram mantidos em condições ambientais padrão com ciclo claro:escuro de 12:12 horas, recebendo água e alimento *ad libitum* durante todo o período experimental. Os animais foram divididos

em Sedentários ($n=83$; $16,13 \pm 0,17g$) e Exercitados ($n=83$; $16,16 \pm 0,16g$). Após 4 semanas, os animais dos 2 grupos foram subdivididos em Controle e EAE, formando os subgrupos: S-C ($n=41$), E-C ($n=42$), S-EAE ($n=42$) e E-EAE ($n=41$), conforme se observa na **Figura 01**.

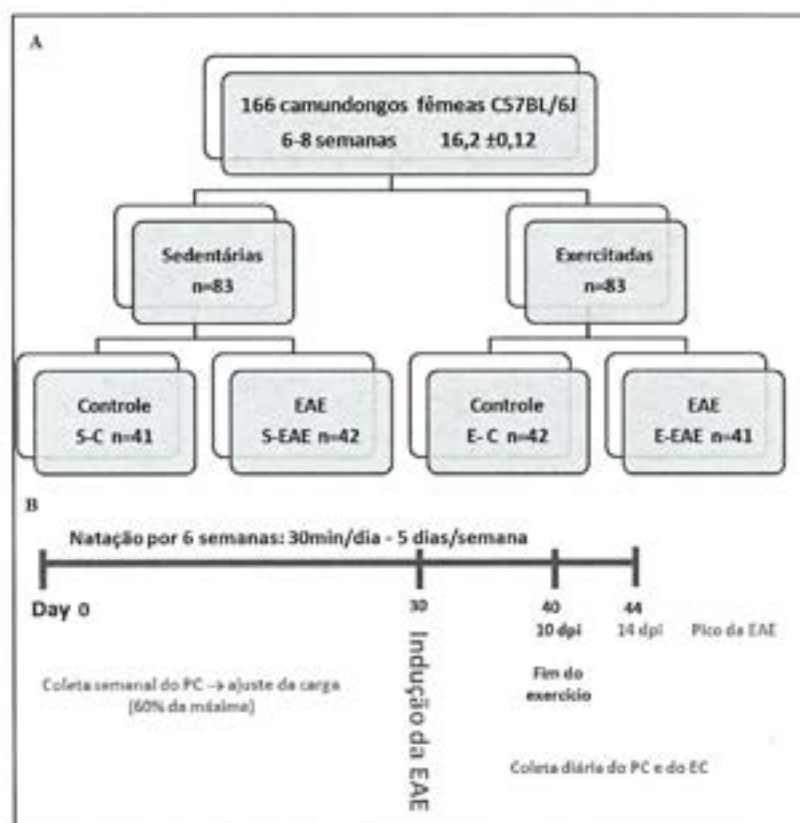


Figura 01. Condições de estudo do Experimento "A". A) Animais e grupos experimentais. B) Desenho Experimental. Legenda: PC = Peso Corporal; EC = Escore Clínico.

2.2. O protocolo de exercício físico

Nos experimentos "A", o protocolo de exercício físico de natação foi realizado em piscina apropriada para camundongos. A água da piscina foi mantida em temperatura constante de $31 \pm 1^\circ C$ e trocada diariamente por questões de higiene. Os procedimentos apresentados a seguir para adaptação dos animais ao meio líquido, teste de desempenho e

determinação da carga de treinamento foram previamente descritos (Almeida, Gomes-Filho *et al.*, 2009). Inicialmente, os camundongos passaram por um aumento gradativo do tempo de permanência na piscina iniciando-se em 10 minutos e aumentando em 05 minutos até que atingissem o tempo de 25 minutos contínuos. Nesse período, os animais aclimatizam ao meio líquido e os eventos de flutuação tornam-se mais constantes. Assim, ao final da primeira semana, realizou-se um teste de desempenho para estabelecer uma carga de treinamento a ser imposta ao animal.

O teste foi iniciado com 2% do peso corporal do animal atado à sua cauda e, a cada 3 minutos, foram acrescidos mais 2% até que o animal não conseguisse mais manter a cabeça na superfície da água. Nesse momento, o animal foi retirado da água e o tempo de teste bem como a porcentagem do peso corporal atingidos, anotados. O teste durou em média 12 a 18 minutos a depender do desempenho do animal, com cargas atingidas entre 10 e 18% do peso corporal. A carga atingida nesse momento foi estabelecida como máxima e os animais exercitados regularmente a partir da segunda semana, 05 vezes/semana, por 30 minutos, com 60% desse valor atado à cauda. Para a manutenção da carga de exercício, os animais foram pesados no início de cada semana e a carga, de 6-8,4% do peso corporal, ajustada. É importante observar que a carga média de treinamento para os 83 animais exercitados foi de $6,8 \pm 1,1\%$ do peso corporal (média \pm desvio padrão), fornecendo um baixo coeficiente de variação (16,5%).

Este protocolo durou 06 semanas e foi finalizado 10 dias após a indução da EAE. A data de término do protocolo foi escolhida por ser caracterizada como o início do aparecimento dos sinais clínicos (Dos Santos, Roffe *et al.*, 2008; Berard, Wolak *et al.*, 2010), uma vez que nosso objetivo foi avaliar as interações entre uma aumentada aptidão física prévia e o desenvolvimento da doença. É importante observar que 06 semanas de exercício regular de natação em camundongos promovem estímulo suficiente para melhora da aptidão

cardiovascular (Evangelista, Brum *et al.*, 2003) e muscular (Oh-Ishi, Kizaki *et al.*, 1996) além possuir efeitos anti-inflamatórios (Almeida, Gomes-Filho *et al.*, 2009) e neuroprotetores (Deforges, Branchu *et al.*, 2009).

Ainda nos experimentos “A”, os animais sedentários foram colocados dentro da piscina, sobre uma plataforma, permanecendo assim no mesmo ambiente pelo mesmo tempo que os animais exercitados, durante as seis semanas experimentais. Finalmente, para minimizar o estresse da ativação dos mecanismos de controle da temperatura corporal, após cada sessão de natação, os animais dos dois grupos foram cuidadosamente secados com uma toalha de banho e recolocados em suas gaiolas.

2.3. O protocolo de indução e a avaliação clínica da EAE

A indução da encefalomielite autoimune experimental (EAE) ocorreu na quinta semana experimental, sendo realizada conforme previamente descrito (Dos Santos, Barsante *et al.*, 2005; Dos Santos, Roffe *et al.*, 2008) e detalhada a seguir.

Os animais foram inicialmente pesados e depilados na região da base da cauda, local da injeção da emulsão antigênica. O peso inicial é um dado importante para cálculo do delta corporal no decorrer do estudo, uma vez que a apresentação clínica da EAE é acompanhada de significativa redução de massa corporal (Kerfoot, Norman *et al.*, 2006). Na semana da indução, os animais sedentários e exercitados atingiram valores similares de peso corporal (sedentários: $18,82 \pm 0,14$ e exercitados: $18,80 \pm 0,17$; $P > 0,05$; teste *Mann Whitney*). Após a depilação e coleta do peso, os animais foram mantidos para habituação no local de indução, para preparo dos reagentes.

Na indução, cada animal recebeu 100µg de peptídeo murino MOG₃₅₋₅₅ (sequência MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) diluídos em 50µL de salina e 50µL de Adjuvante

completo de Freund (CFA) suplementado com 4,0 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). Estas duas soluções (salina e CFA) foram homogeneizadas com o auxílio de um *three way*, sendo 50µL da emulsão injetadas subcutaneamente de cada lado na região da base da cauda dos animais, totalizando 100µL de emulsão contendo 100µg de MOG₃₅₋₅₅ por animal. Após este procedimento, os animais receberam injeção intraperitoneal (ip) 300ng de toxina *Bordetella pertussis* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluída em 200µL de salina. Este último procedimento (injeção ip de toxina *pertussis*) foi repetido 48 horas após a indução. Os animais dos grupos controle (SC e EC) receberam injeções de salina nos mesmos locais anatômicos e nos mesmos momentos.

Nos dias seguintes a indução, diariamente, os animais foram pesados e observados quanto aos sinais clínicos característicos do modelo. O escore clínico utilizado neste estudo foi previamente descrito (Kerfoot e Kubes, 2002). Este se caracterizou por atribuição de pontos (0 a 4) de acordo com o fenótipo apresentado sendo:

- 0) Sem sinais clínicos;
- 1) Paralisia da cauda;
- 2) Paralisia da cauda e fraqueza nas patas posteriores (paresia posterior);
- 3) Paralisia de cauda e patas posteriores;
- 4) Paralisia de cauda e patas posteriores e fraqueza nas patas anteriores.

Neste estudo, os animais apresentando paralisia de parte da cauda no início da apresentação clínica receberam escore 0,5. Este acompanhamento clínico foi realizado até 14 dias após a indução (14dpi), pois estudos prévios do nosso grupo demonstraram ser esse o pico das apresentações clínicas (Dos Santos, Barsante *et al.*, 2005; Dos Santos, Roffe *et al.*, 2008). As análises estatísticas foram realizadas por métodos paramétricos ou não-paramétricos de acordo a normalidade dos dados e são detalhadas na descrição dos resultados. O valor de significância foi estabelecido em $P < 0,05$.

2.4. Resultados observados no Experimento "A"

Para avaliar os efeitos do exercício físico prévio (6 semanas) no desenvolvimento clínico da EAE, animais sedentários ($n=42$) e exercitados ($n=41$), que receberam injeção contendo MOG₃₅₋₅₅ foram monitorados diariamente até a o pico da doença em 14 dpi. Seguindo este protocolo, podemos observar na Figura 02 e na Tabela 03 que o exercício regular de natação foi capaz de atenuar a apresentação clínica da doença até seu pico. Na **Figura 02**, a análise de variância de duas vias revelou efeito dos **dias pós indução** ($F_{13,1134}=147,07$; $P<0,0001$), do **exercício** ($F_{1,1134}=51,77$; $P<0,0001$) e da **interação** de ambos os fatores ($F_{13, 1134}=5,59$; $P<0,0001$) com diferença significativa observada entre 10 e 14 dpi ($P<0,05$; teste *post hoc* de Bonferroni). O teste *Mann Whitney* para cada dia observado confirmou as diferenças entre 10 e 14 dpi ($P<0,05$), e adicionalmente, mostrou diferença em 09 dpi ($P<0,05$).

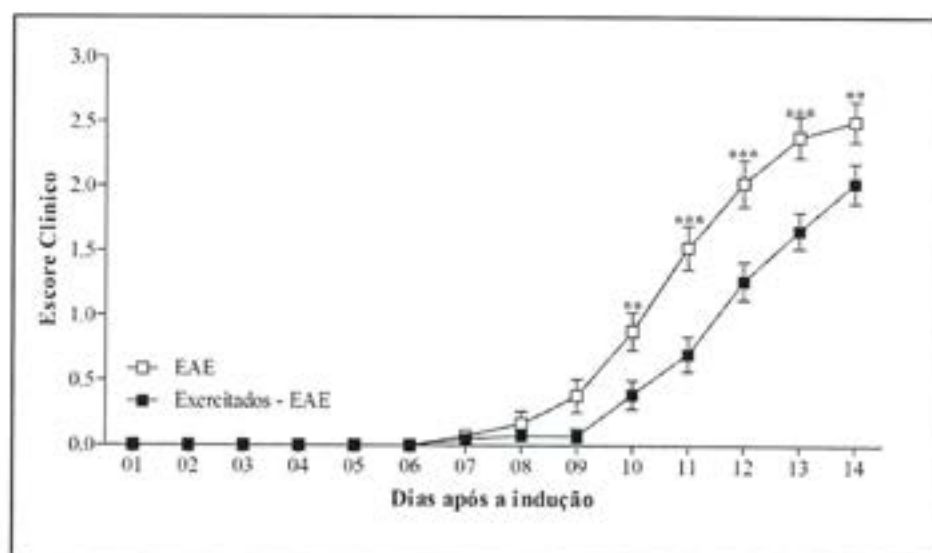


Figura 02. Sinais clínicos da encefalomielite autoimune experimental (EAE) em animais sedentários e exercitados do Experimento "A". Dados apresentados como média±EPM. Diferenças observadas entre 10 e 14 dpi ($P<0.01$ pelo teste *post hoc* de Bonferroni) e entre 09 e 14 dpi ($P<0.05$ pelo teste *Mann Whitney* para cada dia observado, não demonstrado).

Na **Tabela 03** podemos observar que, exceto a incidência, todos os parâmetros clínicos da EAE foram atenuados/atrasados pelas seis semanas prévias de exercício físico regular de natação. Estes dados incluíram o dia de início doença (*onset*), o escore clínico máximo e o índice cumulativo de escore. Os dados estão apresentados como média e erro padrão da média (EPM), sendo o valor mediano apresentado entre parênteses e foram analisados pelo teste de *Mann Whitney* (o valor de P é demonstrado na quarta coluna da tabela). *Onset* foi definido como o segundo dia consecutivo de paralisia da cauda ou escore superior (Brambilla, Ashbaugh *et al.*, 2011). O escore clínico máximo foi caracterizado como a pontuação máxima que cada animal atingiu independente do dia após a indução. O índice cumulativo foi calculado a partir da soma dos escores de cada animal entre 0 e 14 dpi, caracterizando-se, portanto como análise de área sobre a curva (Brambilla, Ashbaugh *et al.*, 2011).

Tabela 03 – Parâmetros clínicos da EAE em animais sedentários e exercitados avaliados até o pico da doença (14 dpi) no experimento “A”. Os dados estão apresentados como média e erro padrão da média (\pm), sendo o valor mediano apresentado entre parênteses.

Variáveis	Sedentários (n=42)	Exercitados (n=41)	P
Incidência (%)	95,24 \pm 3,33	95,12 \pm 3,41	0,9902
<i>Onset</i> (dia)	11,38 \pm 0,24 (11,0)	12,14 \pm 0,22 (12,0)	0,0139
Escore clínico máximo	2,76 \pm 0,16 (3,0)	2,15 \pm 0,15 (2,0)	0,0041
Índice cumulativo	9,93 \pm 0,78 (11,0)	6,24 \pm 0,60 (5,0)	0,0004

Conforme salientado no item 2.2 sobre descrição do protocolo de exercício físico, a carga média de treinamento para os 83 animais exercitados no experimento “A” foi de

B6,8±1,1% do peso corporal, sendo que valores similares foram observados nos grupos isoladamente (controle 6,80±1,11% e grupo EAE 6,76±1,13% do peso corporal). Outra informação relevante é que não houve qualquer correlação entre os parâmetros clínicos da EAE com a carga de treinamento imposta aos animais desse grupo, conforme se observar na **Tabela 04**. Esta análise foi realizada pelo método de correlação não paramétrica de *Spearman* (o valor de *P* é demonstrado na terceira coluna da tabela) e evidencia a uniformidade do protocolo de exercício mesmo com cargas individuais calculadas semanalmente.

Tabela 04 – Parâmetros clínicos da EAE dos animais exercitados no experimento “A” e testados para correlação com a intensidade da carga de treinamento imposta durante o protocolo de exercício regular realizado antes da indução e mantido até o início do desenvolvimento clínico.

Variáveis	Índice de correlação de <i>Spearman</i>	P
Incidência (%)	0,18	0,3
<i>Onset</i> (dia)	-0,02	1,0
Escore clínico máximo	-0,10	0,5
Escore em 14 dpi	-0,07	0,7
Índice cumulativo	-0,06	0,7

O acompanhamento diário da evolução da massa corporal com cálculo do peso relativo (%) a partir do valor coletado no dia da indução, mostra na **Figura 03** que os animais dos grupos controle mantiveram-se com valores constantes ao longo dos 14 dias de análise. Contudo, os animais EAE apresentaram progressiva redução ponderal a partir do dia em que o escore clínico foi elevado. Adicionalmente, observamos que os animais EAE exercitados apresentaram atenuação da redução ponderal em relação aos sedentários e, novamente,

coincidente com a resposta de atenuação no escore clínico. A análise de variância de duas vias entre os dois grupos **EAE** revelou efeito dos **dias pós indução** ($F_{14,1153}=47,33$; $P<0,0001$), do exercício ($F_{1,1153}=33,87$; $P<0,0001$) e da interação de ambos os fatores ($F_{14,1153}=3,13$; $P<0,0001$) com diferença significativa observada entre 09 e 14 dpi ($P<0,05$; teste *post hoc* de *Bonferroni*). A comparação entre os dois grupos **sedentários** (controle e EAE) mostrou um efeito dos dias pós indução ($F_{14,1146}=15,96$; $P<0,0001$), da **EAE** ($F_{1,1146}=608,8$; $P<0,0001$) e da interação de ambos os fatores ($F_{14,1146}=35,33$; $P<0,0001$) com diferença significativa observada em 01 entre 08 e 14 dpi ($P<0,05$; teste *post hoc* de *Bonferroni*; não demonstrado no gráfico). A comparação entre os dois grupos **exercitados** (controle e EAE) mostrou um efeito dos dias pós indução ($F_{14,1141}=9,92$; $P<0,0001$), da **EAE** ($F_{1,1141}=480,74$; $P<0,0001$) e da interação de ambos os fatores ($F_{14,1141}=22,74$; $P<0,0001$) com diferença significativa observada em 01, entre 03 e 07 e entre 10 e 14 dpi ($P<0,05$; teste *post hoc* de *Bonferroni*; não demonstrado no gráfico).

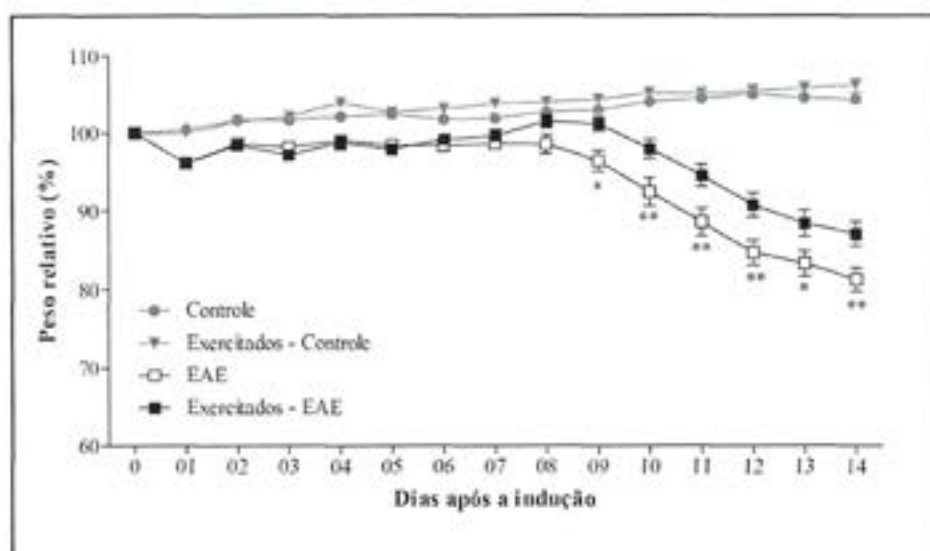


Figura 03. Peso relativo dos animais controle e EAE, sedentários e exercitados do Experimento "A". Dados apresentados como média±EPM. Os asteriscos indicam as diferenças observadas entre os dois grupos EAE para os dias 09 a 14 após a indução ($P<0,05$ pelo teste *post hoc* de *Bonferroni*).

3. Experimento “B” – *University of Miami*

Em se tratando de experimentos realizados em outro laboratório e país, e a diferente realidade de recursos originais e regras de utilizações dos espaços e manuseio dos animais, foram necessárias algumas adaptações nos protocolos experimentais.

3.1. Animais e condições experimentais para realização do estudo

Os 47 camundongos fêmeas C57BL/6J (07 semanas de idade), pesando $16,45 \pm 0,11$ gramas (média \pm EPM) foram fornecidos pelo *Jackson Laboratory*. Estes animais foram mantidos em ambiente *virus/antigen-free*, com temperatura e umidade controlados e ciclo claro:escuro de 12:12 horas, recebendo água e alimento *ad libitum* durante todo o período experimental. Os animais foram divididos em Sedentários (n=24; $16,3 \pm 0,16$ g) e Exercitados (n=23; $16,6 \pm 0,14$ g) e, após quatro semanas de exercício (sendo a primeira de adaptação ao meio líquido), imunizados para o modelo EAE. Os animais, esquemas de tratamento e desenho experimental do protocolo de experimento “B” pode ser observado na **Figura 04**.

3.2. O protocolo de exercício físico utilizado no estudo

Nos experimentos “B”, o protocolo de exercício físico de natação foi realizado em tanques de plástico com 25 cm de altura por 28 cm de diâmetro, preenchidos com 20 cm de água mantida em $31 \pm 1^\circ\text{C}$ e trocada diariamente. Assim como no experimento “A”, os animais do experimento “B” foram adaptados ao meio líquido, atingindo ao final 25 minutos contínuos de permanência da água.

3.3. O protocolo de indução e a avaliação clínica da EAE

Assim como no experimento “A”, indução da encefalomielite autoimune experimental (EAE) para o experimento “B” ocorreu na quinta semana experimental, sendo realizada conforme previamente descrito (Dos Santos, Roffe *et al.*, 2008; Brambilla, Ashbaugh *et al.*, 2011).

Na indução, cada animal recebeu 100µg de Peptídeo MOG₃₅₋₅₅ (sequência MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK; Bio Synthesis Inc.) diluídos em 50µL de salina e 50µL de Adjuvante completo de Freund (CFA) suplementado com 4,0 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). As soluções (salina e CFA) foram homogeneizadas com o auxílio de um homogeneizador, sendo 100µL da emulsão injetadas subcutaneamente na região cervical dos animais, após anestesia gasosa. Após este procedimento, os animais receberam injeção intraperitoneal (ip) 300ng de toxina *Bordetella pertussis* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluída em 200µL de salina. Este último procedimento (injeção ip de toxina *pertussis*) foi repetido 48 horas após a indução.

Nos dias seguintes a indução, os animais foram pesados e observados quanto aos sinais clínicos característicos do modelo, seguindo o mesmo critério de pontuação do experimento “A”. Este acompanhamento clínico foi realizado diariamente até 42 dias após a indução (42dpi), objetivando-se a análise dos efeitos de 06 semanas de exercício regular de natação sobre a fase crônica da EAE. Vale salientar que, na semana da indução, os animais sedentários e exercitados atingiram valores de peso corporal absoluto similar aos observados no experimento “A”, e não foram diferentes entre si (sedentários: 18,40±0,22 e exercitados: 18,0±0,17; P>0,05; teste *Mann Whitney*).

3.4. Resultados observados no Experimento "B"

Para avaliar os efeitos do exercício físico no desenvolvimento clínico da EAE, animais sedentários ($n=24$) e exercitados ($n=23$), que receberam injeção contendo MOG₃₅₋₅₅ foram monitorados diariamente até a fase crônica da EAE em 42 dpi. Seguindo este protocolo, podemos observar que o exercício regular de natação atenuou a apresentação clínica da doença até a sua fase crônica (Figura 05 e Tabela 05).

Na **Figura 05**, a análise de variância de duas vias revelou efeito dos dias pós indução ($F_{41,1890}=14,12$; $P<0,0001$) e do **exercício** ($F_{1,1890}=123,84$; $P<0,0001$). No entanto, não houve efeito da interação entre ambos os fatores ($F_{41,1890}=1,06$; $P>0,05$), e nem diferença significativa observada em cada dia ($P>0,05$; teste *post hoc* de Bonferroni). O teste *Mann Whitney* entre as duas curvas confirmou, porém, o efeito do exercício, mostrando diferença entre os dois grupos por o período experimental ($P<0,0001$), assim como quando analisado ponto a ponto, conforme se observa na figura abaixo.

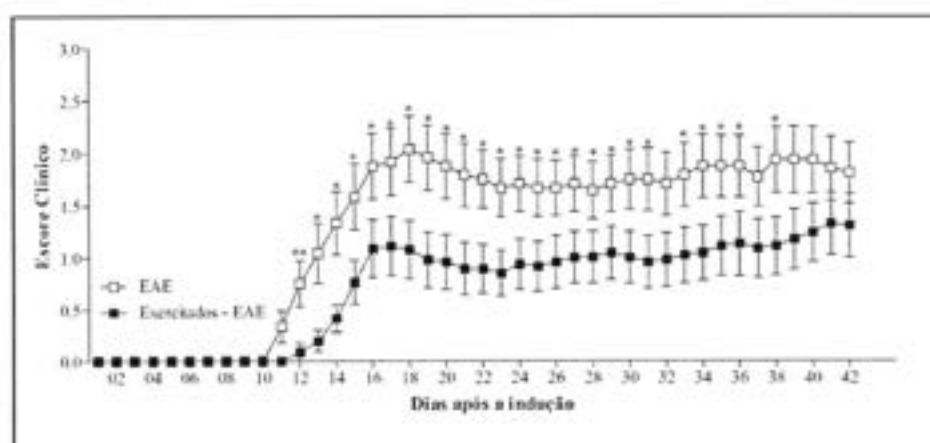


Figura 05. Sinais clínicos da encefalomielite autoimune experimental (EAE) em animais sedentários e exercitados do Experimento "B". Dados apresentados como média±EPM. Os asteriscos demonstram as diferenças observadas ($P<0,05$; teste *Mann Whitney* em cada dia). A curva dos animais exercitados é significativamente diferente da curva dos animais sedentários ($P<0,0001$; teste *Mann Whitney*).

Assim como na Tabela 03, a **Tabela 05** mostra atenuação dos parâmetros clínicos da EAE nos animais exercitados em relação aos sedentários, exceto pela incidência. Ou seja, o dia de início doença (*onset*), o escore clínico máximo e o índice cumulativo de escore foram significativamente diferentes entre os grupos. Os dados estão apresentados como média e erro padrão da média (EPM), sendo o valor mediano apresentado entre parênteses. *Onset* e escore clínico máximo foram analisados pelo teste de *Mann Whitney* e o índice cumulativo de escore, foi analisado pelo teste t de *Student* (o valor de P é demonstrado na quarta coluna da tabela).

Tabela 05 – Parâmetros clínicos da EAE em animais sedentários e exercitados avaliados até o a fase crônica da EAE em 42 dpi no experimento “B”. Os dados estão apresentados como média e erro padrão da média (\pm), sendo o valor mediano apresentado entre parênteses.

Variáveis	Sedentários (n=24)	Exercitados (n=23)	P
Incidência (%)	79,17 \pm 8,47	65,22 \pm 10,15	0,2967
<i>Onset</i> (dia)	15,74 \pm 1,25 (14,0)	21,73 \pm 2,57 (17,0)	0,0132
Escore clínico máximo	2,58 \pm 0,31 (3,0)	1,85 \pm 0,32 (2,0)	0,0701
Índice cumulativo	52,15 \pm 8,17 (61,0)	29,63 \pm 6,65 (17,0)	0,0390

A **Figura 06** mostra o acompanhamento diário da evolução da massa corporal pelos 42 dias de análise com cálculo do peso relativo (%) a partir do valor coletado no dia da indução. Novamente, verificamos a progressiva redução ponderal a partir do ponto em que o escore clínico foi elevado nos animais EAE sedentários, e atenuação da resposta nos animais exercitados. Além disso, observamos a recuperação da massa corporal dos animais com a estabilização da doença. A análise de variância de duas vias revelou efeito dos dias pós indução ($F_{42,1949}=3,16$; $P<0,0001$), do **exercício** ($F_{1, 1949}=79,99$; $P<0,0001$), e da interação

entre ambos os fatores ($F_{42,1949}=1,40$; $P=0,0451$), sem diferença significativa observada em qualquer dpi ($P>0,05$; teste *post hoc* de Bonferroni). Teste t de Student entre as duas curvas apontou diferença entre os dois grupos ao longo do período experimental ($P<0,0001$).

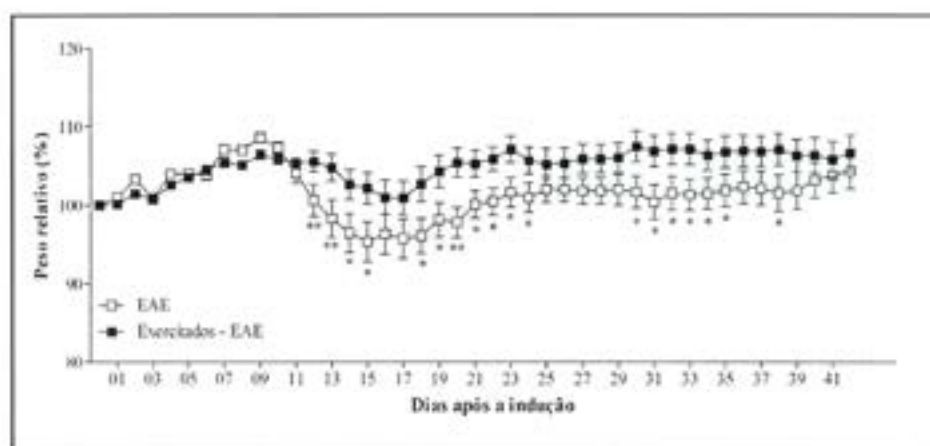


Figura 06. Peso relativo dos animais EAE sedentários e exercitados do Experimento “B”. Dados apresentados como média±EPM. Os asteriscos indicam as diferenças observadas entre os dois grupos ($P<0,05$; teste t de Student). A curva dos animais exercitados é diferente da curva dos animais sedentários ($P<0,0001$; teste t de Student).

**CAPÍTULO II - Estudo dos parâmetros metabólicos em
camundongos exercitados e com EAE**

1. Considerações iniciais

Os últimos estágios da esclerose múltipla foram associados a históricos de desnutrição e perda de massa corporal progredindo para um quadro de caquexia seguido de morte (Kamalian, Keesey *et al.*, 1975; Babbe, Roers *et al.*, 2000). A caquexia é uma síndrome metabólica complexa que ocorre associada a uma enfermidade, sendo caracterizada por perda de massa muscular com ou sem perda de massa adiposa (Evans, Morley *et al.*, 2008; Donohoe, Ryan *et al.*, 2011). Como discutido no Capítulo I, o modelo EAE apresenta concomitante a apresentação clínica, uma importante redução ponderal (Kerfoot, Norman *et al.*, 2006) que tem sido associada a comportamento doentio e anorexia (Pollak, Ovadia *et al.*, 2003).

Por outro lado, é bem estabelecido na literatura o papel do exercício físico regular em promover importantes adaptações metabólicas gerando ambiente protetor contra o desenvolvimento de diversas doenças. Estas alterações incluem diminuição e modificação do infiltrado inflamatório no tecido adiposo (Kawanishi, Yano *et al.*, 2010), menor incidência a infecções (Gleeson, 2007) e proteção contra inflamação de baixo grau (Mathur e Pedersen, 2008). Além disso, tem-se sugerido que o exercício regular possa criar ambiente protetor contra o desenvolvimento do quadro de caquexia e proteger contra a perda de massa muscular associada a esta condição (Donohoe, Ryan *et al.*, 2011; Argiles, Busquets *et al.*, 2012).

Na literatura faltam estudos que enfoquem os efeitos metabólicos provenientes do treinamento físico em animais EAE. Assim, visando buscar um melhor entendimento sobre este assunto, propomos investigar se as alterações metabólicas clássicas promovidas pelo exercício físico regular estariam associadas aos efeitos de atenuação do escore clínico e da redução ponderal observadas nos animais EAE (Capítulo I).

2. Materiais e Métodos

Neste estudo, estão incluídos animais dos grupos S-C (n=19), E-C (n=19), S-EAE (n=21) e E-EAE (n=18) que fazem parte do grupo total de animais estudados no Capítulo I, experimento "A". Sendo assim, as condições experimentais de manutenção desses animais bem como os protocolos de exercício físico e de indução do modelo de EAE seguem as mesmas especificações.

Brevemente, estes animais foram divididos em Sedentários e Exercitados e, após quatro semanas de exercício, os animais dos dois grupos foram subdivididos em Controle e EAE. Os animais EAE receberam injeção com emulsão contendo MOG₃₅₋₅₅ e os animais controle, salina. O protocolo de exercício foi mantido até que os animais atingissem 10 dias de indução (início dos sintomas clínicos) e o acompanhamento diário (coleta de massa corporal e observação do escore clínico) seguiu até os 14 dias após indução.

Aos 14 dpi, os animais foram sacrificados por decapitação para coleta de sangue, fígado, músculo gastrocnêmico e tecido adiposo parametrial. O sangue foi mantido a temperatura ambiente por 30 minutos, centrifugado a 3.000 rpm/5 min, a temperatura ambiente, para separação do soro e usado em seguida para as dosagens. O fígado foi pesado e estocado a -20°C para posterior dosagem do conteúdo de glicogênio. O músculo gastrocnêmio foi pesado e estocado a -20°C para dosagem do conteúdo de glicogênio, ou em nitrogênio líquido para dosagem do conteúdo de citocinas. O tecido adiposo parametrial foi pesado e descartado.

Triglicérides, colesterol e glicose foram dosados no soro por métodos colorimétricos (espectrofotômetro modelo UV-1601PC, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan), utilizando-se kits padronizados da Labtest diagnóstica (Labtest, Barueri, SP, Brasil). Para estas dosagens, 06

animais de cada grupo foram sacrificados após jejum de 12-14 horas. Os dados estão expressos como mg/dL.

Para determinação do conteúdo de glicogênio, o músculo gastrocnêmio e 200 mg de fígado foram digeridos, centrifugados e corados com adição de ácido sulfúrico (Dubois, Gilles *et al.*, 1956). Os tubos foram resfriados e a leitura realizada a 480 nm (espectrofotômetro modelo UV-1601PC, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) com a concentração determinada a partir de um padrão de glicose expressa em 100 nmols de glicose. Para fígado, os dados estão expressos como mg de glicogênio por 100 mg de tecido e para músculo, mg de glicogênio por mL de solução, uma vez que todo o tecido foi homogeneizado e alguns animais não atingiram 100 mg de tecido muscular total. O número total de animais para esta análise foi: S-C (n=05), E-C (n=05), S-EAE (n=06) e E-EAE (n=05).

Para a dosagem do conteúdo de citocinas (TNF e IL-6) musculares, as amostras 05 a 06 animais de cada grupo foram homogeneizadas em solução (100 mg/mL) para extração de citocinas. Esta solução foi preparada a partir de uma solução de tampão fosfato (NaCl a 137mM; KCl a 2,7mM; Na₂HPO₄ a 8,1mM; KH₂PO₄ a 1,5mM) em água destilada, contendo: NaCl a 0,4 M, Tween 20 a 0,05%, Albumina de soro bovino (BSA - *Bovine Serum Albumin*) a 0,5%, Fluoreto de fenilmetilsufonila (PMSF- *Phenylmetilsulfonil fluoride*) a 0,1mM, cloreto de benzetônio a 0,1 mM, EDTA a 10 mM e 20 KI de aprotinina. O homogenato foi centrifugado a 10.000 r.p.m./10 min a 4°C e o sobrenadante recolhido, aliquoteado e estocado a -20°C até o uso. As concentrações das citocinas foram avaliadas no sobrenadante do homogenato em diluição 1:3 em PBS contendo 0,1% de soro albumina bovina (BSA). Os kits ELISA para dosagem das citocinas foram obtidos da R&D Systems (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) e utilizados de acordo com os procedimentos previamente descritos pelo fabricante, em três etapas (1º dia: plaqueamento; 2º dia: bloqueio; 3º dia: detecção/revelação em absorbância). A concentração referente a cada amostra foi

calculada a partir de uma curva padrão correspondente e expressa em pg/mL. O número total de animais para esta análise foi: S-C (n=08), E-C (n=08), S-EAE (n=09) e E-EAE (n=07).

3. Resultados Observados

Na **Tabela 06**, observamos os parâmetros metabólicos dos animais EAE e controles sedentários e exercitados avaliados em 14 dpi com os dados apresentados como média e erro padrão da média (\pm). Estes dados foram inicialmente analisados quanto a sua normalidade, tendo sido encontrado $P>0,05$ e, portanto, analisados por métodos paramétricos. Em seguida, realizamos análise de variância de duas vias para busca de possíveis interações entre os efeitos do protocolo de exercício físico e da indução da EAE sobre o modelo.

A EAE teve efeito isoladamente sobre peso relativo do tecido adiposo ($F_{1,41}=98,07$; $P<0,0001$); peso relativo do músculo gastrocnêmio ($F_{1,41}=6,71$; $P=0,0132$); peso relativo do fígado ($F_{1,41}=25,95$; $P<0,0001$); colesterol ($F_{1,19}=11,66$; $P<0,01$); TNF muscular ($F_{1,19}=10,42$; $P<0,01$) e IL-6 muscular ($F_{1,18}=23,25$; $P<0,0001$). O exercício regular de natação teve efeito isoladamente sobre glicogênio hepático ($F_{1,17}=9,06$; $P<0,01$) e muscular ($F_{1,17}=19,86$; $P<0,001$), sendo que este último foi o único a também ter sido afetado pela interação entre exercício e EAE ($F_{1,17}=7,21$; $P=0,0156$).

O efeito da EAE foi adicionalmente verificado pelo teste t de *Student* comparando-se os dois grupos sedentários e os dois grupos exercitados. Assim, houve diferença entre os dois grupos sedentários para peso relativo do tecido adiposo ($P<0,0001$), peso relativo do músculo gastrocnêmio ($P<0,05$), peso relativo do fígado ($P<0,001$), TNF muscular ($P<0,01$ e $P<0,05$ pelo teste *post hoc* de *Bonferroni*) e IL-6 muscular ($P<0,01$). E houve diferença entre os dois

Tabela 06 – Parâmetros metabólicos dos animais EAE e controles sedentários e exercitados avaliados no pico da doença (14 dpi). Os dados estão apresentados como média e erro padrão da média (\pm).

Variáveis	Grupos			
	SC	EC	SEAE	EEAE
Peso relativo do tecido adiposo	0.80 \pm 0.05 ^a	0.70 \pm 0.07 ^a	0.08 \pm 0.06 ^b	0.21 \pm 0.07 ^b
Peso relativo do músculo gastrocnêmio	0.54 \pm 0.02 ^a	0.53 \pm 0.02 ^a	0.47 \pm 0.02 ^b	0.47 \pm 0.03 ^{a, b}
Peso relativo do fígado	3.71 \pm 0.08 ^a	3.98 \pm 0.11 ^a	4.33 \pm 0.11 ^b	4.32 \pm 0.06 ^b
Glicose sérica (mg/dL)	91.0 \pm 13.2 ^a	95.8 \pm 8.2 ^a	69.7 \pm 5.1 ^a	78.6 \pm 11.3 ^a
Triglicérides séricas (mg/dL)	122.0 \pm 15.3 ^a	127.2 \pm 11.7 ^a	90.2 \pm 20.7 ^a	119.3 \pm 13.2 ^a
Colesterol total (mg/dL)	80.3 \pm 5.6 ^a	82.42 \pm 4.4 ^a	62.8 \pm 5.4 ^b	68.2 \pm 2.8 ^b
Glicogênio hepático (mg/100 mg)	3.07 \pm 0.36 ^a	5.79 \pm 0.41 ^b	3.09 \pm 0.68 ^a	3.74 \pm 0.64 ^a
Glicogênio muscular (mg/mL)	0.39 \pm 0.02 ^a	0.47 \pm 0.01 ^b	0.35 \pm 0.03 ^a	0.31 \pm 0.02 ^a
TNF muscular (pg/mL)	163.4 \pm 11.0 ^a	111.2 \pm 12.1 ^b	94.5 \pm 9.7 ^b	96.4 \pm 15.3 ^b
IL-6 muscular (pg/mL)	72.8 \pm 8.9 ^a	54.2 \pm 6.9 ^a	29.8 \pm 5.4 ^b	30.0 \pm 5.2 ^b

Letras iguais na mesma linha indicam dados iguais ou ausência de diferença significativa.

Peso relativo expresso em grama de tecido por 100 gramas de massa corporal.

**CAPÍTULO III - Estudo dos efeitos do exercício físico
regular sobre os parâmetros associados ao desenvolvimento da EAE**

1. Recrutamento de leucócitos para o sistema nervoso central

1.1. Considerações iniciais

As interações entre os leucócitos e o tecido iniciam-se nas células endoteliais com os eventos rolamento e adesão. Esses eventos são mediados pelas moléculas de adesão tanto nos leucócitos quanto no endotélio. Nosso grupo de pesquisa tem como foco de pesquisa a elucidação dos mecanismos moleculares e celulares associados a essas interações leucócito-endotélio na microvasculatura do SNC em diferentes condições neuroinflamatórias. Anteriormente demonstramos que o atenuado escore clínico dos animais EAE deficientes para o receptor de bradicinina pode estar associado com menor adesão de leucócitos na microvasculatura cerebral assim como menor infiltrado submeningeal, em cérebro e medula espinhal, aos 14 dias após a indução (Dos Santos, Roffe *et al.*, 2008).

Neste sentido, com o intuito de verificar se o atenuado escore clínico dos animais EAE exercitados do presente estudo também foi associado com menor recrutamento de células inflamatórias ao SNC, mensuramos as interações leucócito-endotélio (rolamento e adesão) associadas à evidência histopatológica. É importante ressaltar que neste estudo, foi padronizado o uso de uma nova técnica de visualização da microvasculatura do SNC com janelas simultâneas em cérebro e medula espinhal para acompanhamento do recrutamento de leucócitos *in vivo* por microscopia intravital de fluorescência. Esta técnica fornece avaliação quantitativa em tempo real da dinâmica de células circulantes e recrutadas.

1.2. Materiais e Métodos

Para este estudo, estão incluídos alguns dos animais dos grupos S-C (n=21), E-C (n=21), S-EAE (n=22) e E-EAE (n=22), que fazem parte do grupo total de animais estudados no Capítulo I (experimento "A"), e que foram mantidos nas mesmas condições experimentais referidas previamente. Além desses animais, um grupo adicional de 32 animais EAE, sendo 16 sedentários e 16 exercitados, estudados aos 10 dias após a indução estão incluídos neste capítulo.

Sendo assim, ao início deste estudo, os 118 animais foram divididos em Sedentários (n=59) e Exercitados (n=59) e, após quatro semanas de exercício (sendo a primeira de adaptação e teste de desempenho), estes animais foram subdivididos em Controle (n=42) e EAE (n=76). Os animais EAE receberam injeção com emulsão contendo MOG₃₅₋₅₅ e os animais controle, salina, conforme descrição no capítulo I. O protocolo de exercício foi mantido até que os animais atingissem 10 dias de indução (início dos sintomas clínicos), conforme descrito no capítulo I.

Quando completados 10 dias após a indução, 32 animais EAE, sendo S-EAE (n=16) e E-EAE (n=16) foram estudados quanto aos parâmetros neuroinflamatórios que serão descritos a seguir. Esta análise foi realizada entre 4 e 6 horas após a última sessão de exercício, uma vez que tem sido sugerido um tempo necessário de pelo menos 2 a 3 horas para retorno dos valores basais de IL-6 e das respostas antiinflamatórias mediadas por esta citocina que advém de uma sessão de exercício físico (Castellano, Patel *et al.*, 2008). Os outros animais, referidos no início deste capítulo, continuaram o acompanhamento diário (coleta de massa corporal e observação do escore clínico) até 14 dpi, quando então, passaram pelos mesmos procedimentos de análise dos parâmetros neuroinflamatórios.

O primeiro protocolo experimental realizado foi a microscopia intravital. Esta foi realizada sobre a microvasculatura cerebral e da medula espinhal nos animais controle

(sedentários e exercitados) em 14 dpi e nos animais EAE (sedentários e exercitados) em 10 e 14 dpi seguindo padronização previamente descrita (Dos Santos, Barsante *et al.*, 2005; Odoardi, Kawakami *et al.*, 2007; Dos Santos, Roffe *et al.*, 2008). Cerca de 8-9 animais por grupo foram anestesiados (i.p.) com ketamina (60 mg/Kg, Laboratório Cristália, SP) e xilazina (10 mg/kg, Rompun®, Bayer) foram perfundidos e canulados pela veia da cauda para receber 200µL da substância fluorescente Rodamina 6G (0,5 mg/mL, SigmaPharm, SP). Em seguida, foram fixados em um aparato similar a estereotáxico de acrílico, mantidos em temperatura constante de 37°C com o auxílio de uma manta térmica e as cirurgias de craniotomia e laminectomia realizadas.

A craniotomia foi realizada na região parietal com o auxílio de uma mini broca, onde a dura-máter foi removida e a microvasculatura sobre a pia-máter exposta para visualização. Depois da cirurgia de craniotomia, uma incisão de 2-3 cm com afastamento da musculatura paravertebral seguida de laminectomia foi realizada na região tóraco-lombar, criando uma abertura de 0,5-1 cm de extensão para visualização da microvasculatura associada à substância branca da medula espinhal. Após os procedimentos cirúrgicos, os animais foram transferidos para o microscópio (Zeiss Imager M.2), sendo mantidos em temperatura constante de 37°C e com as respectivas janelas mantidas sob constante perfusão com fluido cérebro-espinhal artificial (aCSF), pH 7.4 contendo em mol/L: 132 de NaCl; 2,95 de KCl; 1,71 de CaCl₂; 0,64 de MgCl₂; 24,6 de NaHCO₃; 3,71 de dextrose e 6,7 de uréia. O aCSF também era mantido em temperatura constante de 37°C com o auxílio de um banho.

A fluorescência associada ao fluorocromo foi visualizada no microscópio utilizando-se objetiva 20X de longa distância (20XLD) e filtro de emissão 590 nm e de excitação 510-560 nm. Foram considerados aderidos os leucócitos que permaneceram no endotélio vascular por um período de 20s e o rolamento foi considerado para os leucócitos que migraram da região central para a margem do vaso com velocidade menor que dos eritrócitos. Foram

estabelecidas extensões de comprimento dos vasos analisados em 100 μm e diâmetros de 40 a 115 μm para microvasculatura cerebral e de 20 a 60 μm para microvasculatura da medula espinhal.

Para continuar com as investigações sobre o perfil neuroinflamatório, animais anestesiados (i.p.) com ketamina (60 mg/Kg, Laboratório Cristália, SP) e xilazina (10 mg/kg, Rompun®, Bayer) foram perfundidos transcardialmente com 10 mL de salina e 10 mL formalina a 10%. Quando foi possível, a fim de minimizar o número de animais necessários ao estudo, os camundongos perfundidos foram os mesmos que passaram pela microscopia intravital. Após a perfusão, cérebro e medula espinhal foram rapidamente colocados em tampão formalina a 10% para fixação.

Em seguida, os tecidos fixados foram encaminhados ao laboratório de Neuroimunopatologia Experimental do Departamento de Patologia (ICB/UFMG) para serem desidratados, diafanizados, incluídos em parafina, submetidos à microtomia e corados. Os cérebros foram seccionados no plano coronal ao nível dos ventrículos laterais e terceiro ventrículo e as medulas, transversalmente em três níveis (cervical, torácico e lombar), resultando em 03 segmentos de aproximadamente 04 cm, sendo analisados os segmentos torácicos e lombares. Cortes de 06 μm foram corados com hematoxilina e eosina (H&E) para interpretação histológica de rotina e graduação das alterações inflamatórias.

Após a coloração, as imagens das lâminas foram obtidas em Microscópio Olympus BX51 (Olympus, Tóquio, Japão), utilizando-se objetivas de 04X, 10X e 20X, sendo capturadas com resolução de 1392x1040 pixels e transferidas por meio de uma câmera colorida Cool SNAP para um sistema de vídeo acoplado ao computador através do programa Image-Pro Express versão 4.0 para Windows (Media Cybernetics, Bethesda, MD, EUA). As imagens foram avaliadas de forma qualitativa quanto à presença ou ausência de infiltrado inflamatório.

As imagens de medula espinhal coradas com H&E foram adicionalmente processadas e quantificadas por densitometria óptica (DO), através do software livre *ImageJ-ImageProcessing and Analysis in Java*. (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Para isso, as imagens das medulas foram coletadas conforme as especificações do equipamento acima no aumento de 04X em 04 quadrantes simétricos, sendo 02 das regiões dos funículos anteriores e 02 do funículo posterior. A seguir, com o auxílio do software *ImageJ*, estas imagens foram convertidas para 8-bits e processadas igualmente para diminuição do background com ajuste automático do limiar, usando a máxima entropia. Através desse limiar, a porcentagem de celularidade foi aceita como equivalente a intensidade dos pixels por região selecionada.

Em cerca de 6-8 animais/grupo, 05 μ L de sangue foram coletados da cauda e diluídos em 195 μ L de solução de Turk (Merck, Darmstadt, Alemanha). A partir dessa suspensão, 10 μ L foram colocados em câmara de Neubauer para a contagem total das células em microscópio óptico (Olympus, Tóquio, Japão), com aumento de 10X. O valor encontrado foi multiplicado pelo fator de diluição (40) e pelo fator de correção da câmara de Neubauer (10^4), conforme descrito previamente (Lacerda-Queiroz, 2007). Para os animais controle, a coleta de dados sobre leucócitos circulantes foi realizada em 10 e 14 dpi, mas os animais foram sacrificados em 14 di. Para os animais EAE, a coleta de dado sobre leucócitos circulantes foi realizada em 10 e 14 dpi, anteriormente ao sacrifício. Os tecidos dos animais sacrificados após essa coleta foram processados para análise dos níveis de citocinas mencionadas no capítulo II e no próximo item deste capítulo.

O recrutamento de leucócitos na Figura 07, a análise por DO na Figura 12 e a contagem de células sanguíneas circulantes na Figura 13 estão expressos como média e erro padrão da média. O recrutamento de leucócitos nas Figuras 08 a 10 estão apresentados como mediana e *range*. As possíveis interações entre os efeitos do protocolo de exercício físico regular e da indução da EAE sobre o modelo foram investigadas pela análise de variância de

duas vias com teste *post-hoc* de *Bonferroni*. Comparações múltiplas entre controles e os dois tempos da EAE (10 e 14dpi) foram feitas por *Kruskal-Wallis* seguido de *Dunn* ou *Mann Whitney*. O valor de significância foi estabelecido em $P < 0,05$.

1.3. Resultados Observados

Na busca pelo entendimento dos mecanismos celulares associados ao escore clínico atenuado, no período compreendido entre 10 e 14 dpi, dos animais EAE previamente exercitados, foi realizada uma análise *in vivo* dos eventos de rolamento e adesão na microvasculatura do SNC (Figuras 07 a 09) seguida por análise do grau histológico de lesão inflamatória (Figuras 10 e 11). A contagem de leucócitos circulantes (Figura 13) foi usada como parâmetro indicador parcial de ativação periférica dos leucócitos recrutados para o SNC.

Na microvasculatura cerebral, observamos a presença de uma vênula de maior diâmetro, drenando o sangue de pequenas vênulas que coletavam fluxo capilar. Desta janela, coletamos dados de $85,8 \pm 7,2$ vasos por grupo, ou seja, $10,5 \pm 1,9$ vasos por animal ($F_{5,43} = 1,67$; $P > 0,05$ por análise de variância de uma via). Na janela da medula espinhal, também observamos a presença de uma vênula maior em uma posição central coletando sangue de pequenas vênulas pós-capilares. Neste caso, coletamos dados de $79,7 \pm 14,3$ vasos por grupo com $12 \pm 2,5$ vasos por animal ($F_{5,34} = 1,409$; $P > 0,05$ por análise de variância de uma via). Os animais que apresentaram lesões decorrentes da cirurgia foram excluídos dos experimentos.

Os dados de rolamento e adesão, por serem variáveis não paramétricas, foram avaliados por teste de *Kruskal-Wallis*, observando-se $P < 0,0001$, seguido de teste de comparações múltiplas de *Dunn*. Nos animais controles, sedentários e exercitados, ocasionalmente, foram observadas 1 ou 2 células rolando/aderidas por campo tanto em

cérebro quanto em medula espinhal. Estes resultados foram significativamente diferentes dos animais EAE ($P<0,05$; **Figura 07 A-D**). No entanto, não observamos qualquer diferença entre sedentários e exercitados, tanto na condição controle, quanto na condição EAE em 10 ou 14 dpi, em ambos os parâmetros analisados, rolamento (Figura 07 A e C), e adesão (Figura 07 B e D), tanto no cérebro (Figura 07 A e B), quanto na medula espinhal (Figura 07 C e D).

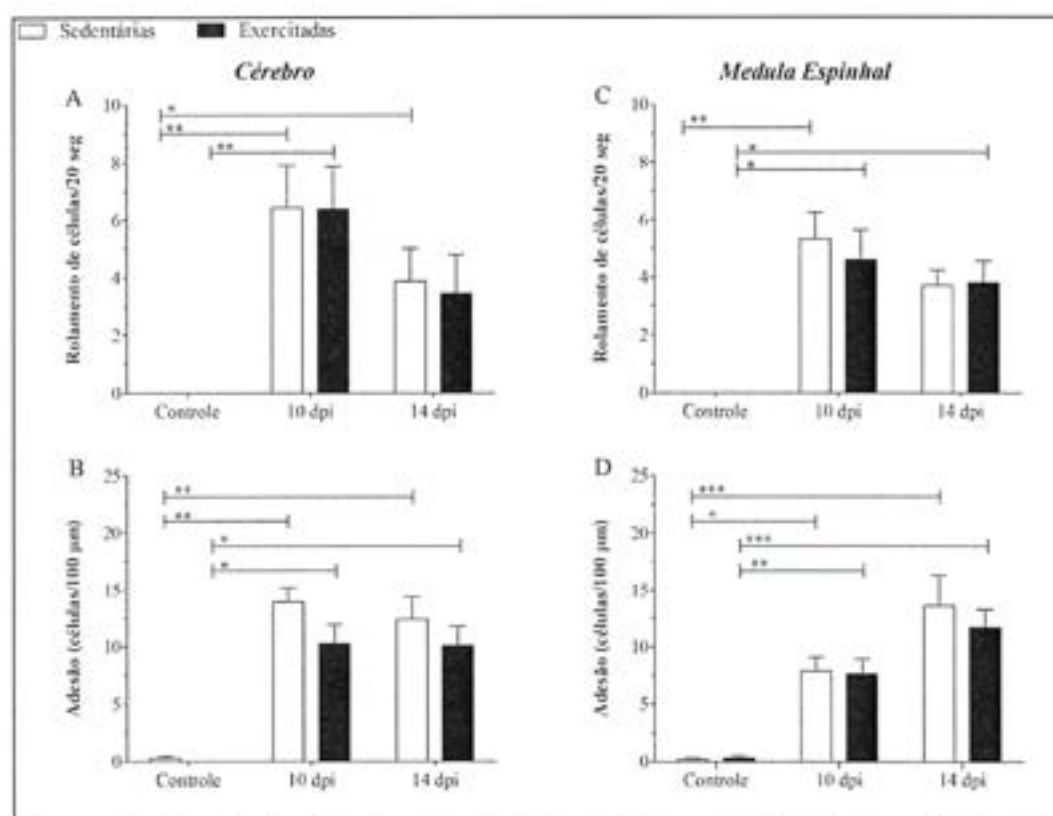


Figura 07. Resultado de microscopia intravital para análise dos parâmetros de rolamento (A e C) e adesão (B e D) em microvasculatura de cérebro (A e B) e medula espinhal (C e D) em 10 e 14 dpi de animais EAE e controle, sedentários e exercitados. Para efeitos ilustrativos, os dados estão apresentados como média±EPM. Os asteriscos indicam as diferenças observadas entre os grupos controle e EAE ($P<0,05$ pelo teste de comparações múltiplas de *Dunn*).

Usando os dados de comprimento e diâmetro dos vasos estudados, conforme descrito na seção materiais e métodos, a análise de adesão celular foi adicionalmente expressa por milímetros quadrados. Este dado fornece a relação entre o número de leucócitos por área de campo estudado e não apenas por vaso, como é o caso da figura anterior com os dados expressos em valores absolutos. Um importante achado desta nova análise é o fato de que corroborou a ausência de diferenças entre os animais sedentários e exercitados tanto em cérebro quanto em medula espinhal. Ou seja, mesmo expressando por área de vaso analisada os animais de ambos os grupos, apresentaram valores similares para adesão nos dois compartimentos do SNC (Figura 08).

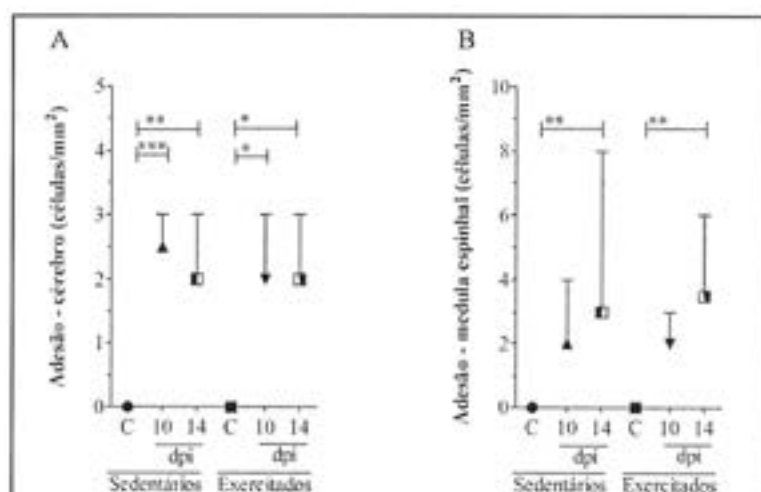


Figura 08. Adesão de leucócitos expressa por mm^2 em microvasculatura de cérebro (A) e medula espinhal (B) em 10 e 14 dpi de animais EAE e controle, sedentários e exercitados. Os dados estão apresentados como mediana e *range*. Os asteriscos indicam as diferenças observadas entre os grupos controle e EAE em 10 e 14 para cérebro e 14 dpi para medula ($P < 0,05$ pelo teste de comparações múltiplas de *Dunn*). A Figura A relaciona-se aos dados da Figura 07-B e a Figura B, aos dados da Figura 07-D. Legenda: C (grupo controle); dpi (dias após a indução).

Ao observarmos os dados de adesão na microvasculatura do cérebro e da medula espinhal expressos por vaso (Figura 07), sugere-se maior recrutamento de células para os vasos cerebrais. No entanto, a expressão relativa por mm^2 (Figura 08) mostra a importância

dos eventos inflamatórios na medula espinhal para o modelo estudado. Adicionalmente, um padrão diferente de resposta entre os dois compartimentos no recrutamento de células com o avançar da apresentação clínica da doença pode ser sugerido (Figura 08).

Sendo assim, considerando que não houve diferenças entre os animais sedentários e exercitados, decidimos estudar isoladamente a relação entre o escore clínico e os dados de rolamento e adesão na microvasculatura do SNC. Para este estudo, 24 animais EAE avaliados entre 10 e 14 dpi, com diferentes escores, foram adicionados às análises para aumento dos graus de liberdade em cada escore. Os dados foram então distribuídos entre as pontuações 0, 1, 2 e 3-4 de escores clínicos e analisados para comparações entre cérebro e medula espinhal por teste de *Mann Whitney*. Animais em escore 4 não eram muito comuns em nossas induções e, por isso, incluímos estess animais com aqueles de escore 3.

Com esta avaliação, observamos, pelos dados expressos por vaso, que enquanto os valores de rolamento cerebral diminuíram nos escores maiores (2-4), os valores de rolamento na medula espinhal não foram alterados em função do escore clínico (**Figura 09-A**). Dessa forma, o rolamento de leucócitos no cérebro dos animais apresentando escores entre 0 e 1, foram maiores do que os apresentando escores 2 a 4, na mesma janela. Além disso, o rolamento de leucócitos na medula espinhal foi maior que no cérebro nos escores 2 a 4. De maneira similar, os vasos da medula espinhal apresentaram maiores valores de adesão que os do cérebro, no escore 3-4, mas o oposto foi observado nos animais de escore zero, corroborando a variação dos dados de acordo com a variação da pontuação clínica (**Figura 09-B**). A expressão dos dados de adesão por mm^2 corrobora o aumento do recrutamento de células com o avançar clínico na medula espinhal (**Figura 10**).

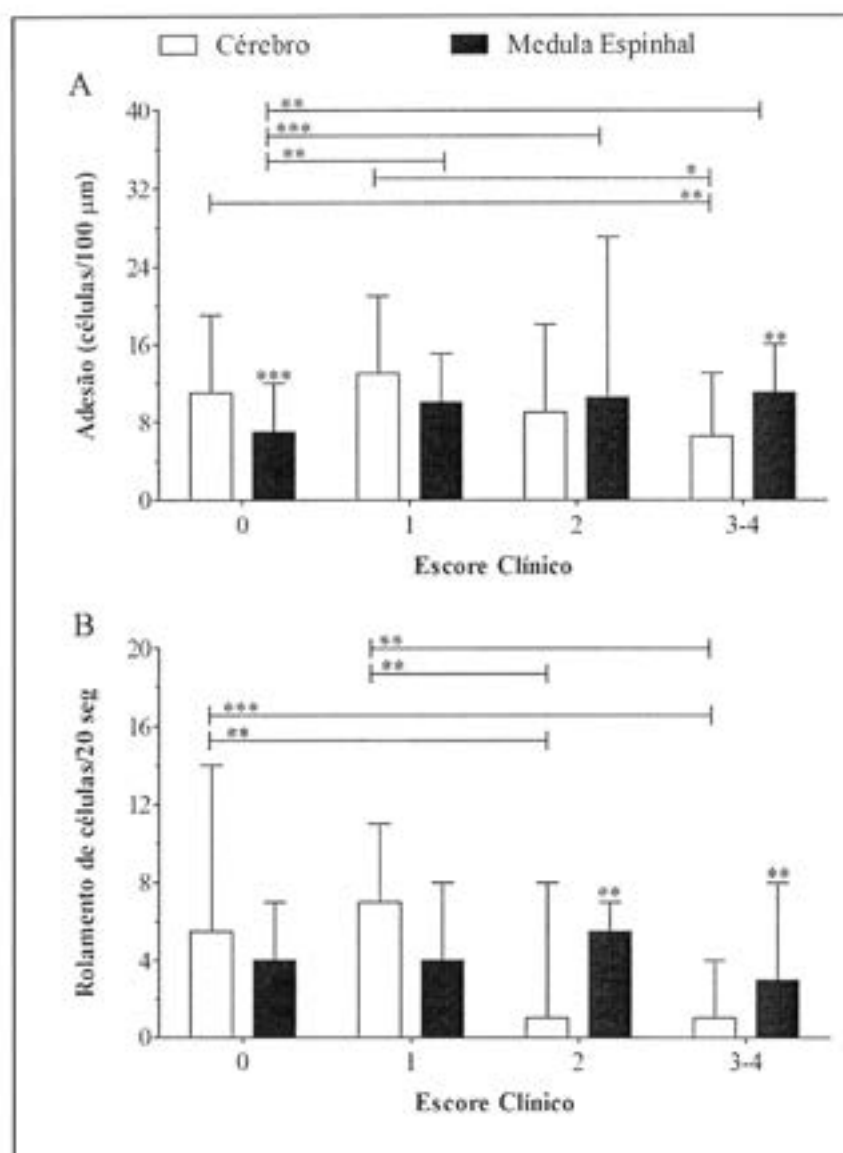


Figura 09. Resultado de microscopia intravital para análise dos parâmetros de adesão (A) e rolamento (B) em microvasculatura de cérebro e medula espinhal de animais EAE avaliados quanto ao escore clínico. Os dados estão apresentados como mediana e *range* e foram analisados por teste de *Mann Whitney*. Os asteriscos sobre as barras indicam diferenças entre dados de cérebro e medula espinhal no mesmo escore. As linhas indicam diferença entre os escores para o mesmo compartimento do SNC. São apresentados dados de 22; 07; 15 e 14 animais em cada escore, respectivamente.

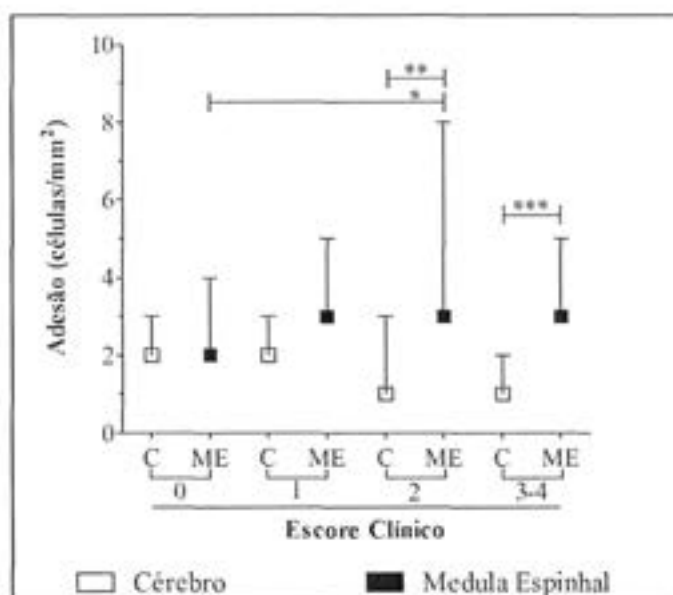


Figura 10. Adesão de leucócitos expressa por mm^2 em microvasculatura de cérebro e medula espinhal de animais EAE avaliados quanto ao escore clínico. Os dados estão apresentados como mediana e *range* e foram analisados por teste de *Mann Whitney*. Houve diferença para o recrutamento de células entre cérebro e medula espinhal nos escore 2 e 3-4 ($P < 0,01$). A adesão de leucócitos para a microvasculatura da medula espinhal atinge seu pico no escore 2 e este valor é diferente do observado no escore zero ($P < 0,05$). Esta figura relaciona-se aos dados da Figura 07-A. São apresentados dados de 22; 07; 15 e 14 animais em cada escore. Legenda: C (Cérebro); ME (Medula Espinhal).

Para continuar com a investigação das bases imunopatológicas possivelmente associadas com a atenuação do escore clínico nos animais EAE exercitados, o estudo dos parâmetros de rolamento e adesão foi complementado com a análise de lesão histopatológica por hematoxilina e eosina (**Figura 11**). Desta análise, evidenciou-se que aos 10 dias após a indução, não houve qualquer infiltrado de células tanto em cérebro quanto em medula espinhal nos animais EAE sedentários e exercitados assemelhando-se aos animais controle (dados não mostrados). Esta observação é adequada ao escore clínico médio apresentado entre 0 e 1, indicando sintomas restritos à região da cauda. No entanto, aos 14 dias após a indução, intensa inflamação submeningeal e parenquimatosa foi observada tanto no cérebro quanto na medula espinhal, nos animais EAE sedentários e exercitados.

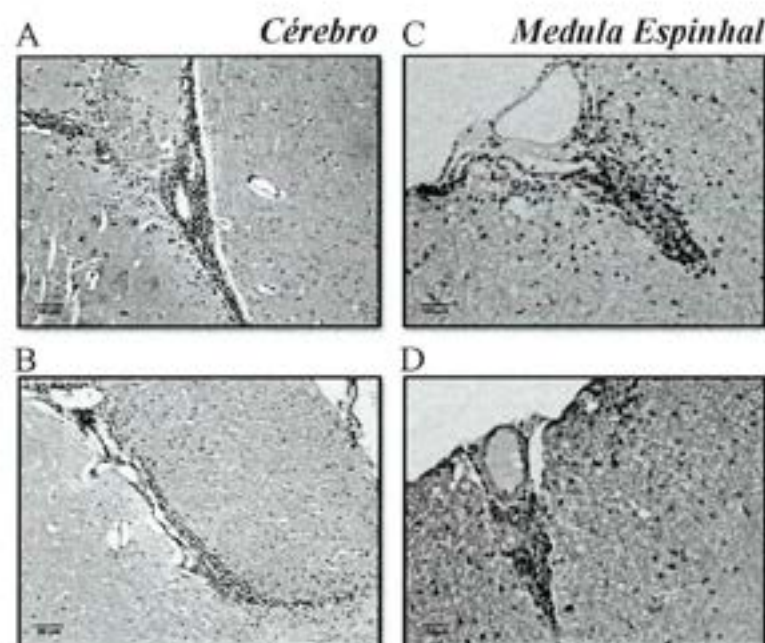


Figura 11. Fotos ilustrativas de cortes de 06 μ m corados por HE e obtidos a partir cérebro (A-B) e medula espinhal (C-D) de animais EAE (14 dpi), sedentários e exercitados. Observe infiltrado de células no forame interventricular cerebral tanto dos animais sedentários (A) quanto exercitados (B) e, infiltrado perivascular na medula espinhal em animais sedentários (C) e exercitados (D) aos 14 dias após a indução. Fotos representativas de 5-6 animais/grupo.

Estes resultados corroboram a ausência de diferença no recrutamento de células observadas pelos parâmetros analisados na microscopia intravital. Além disso, esses dados foram confirmados pela análise quantitativa por densitometria óptica (DO) dos cortes da medula espinhal, conforme se observa na **Figura 12**.

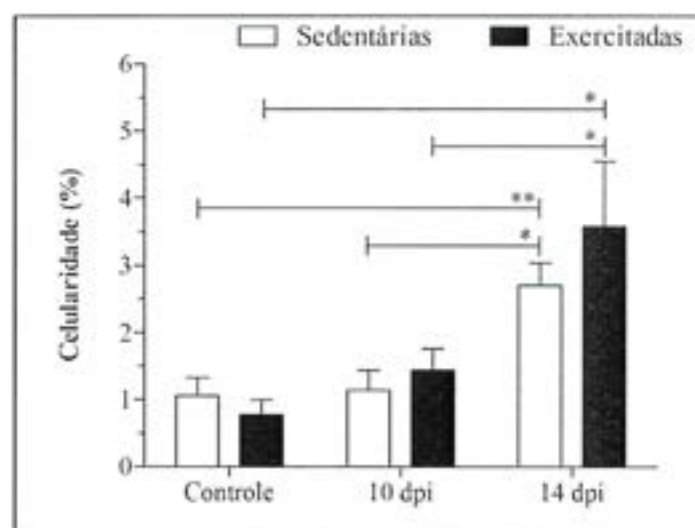


Figura 12. Análise quantitativa por DO dos cortes de 06µm de medula espinhal corados por HE de animais controle e EAE (10 e 14 dpi), sedentários e exercitados. Os dados estão apresentados como média±EPM. Os asteriscos indicam as diferenças observadas entre 10 e 14 dpi para os animais EAE e entre animais controle e EAE em 14 dpi ($P < 0,05$ pelo teste de *Mann Whitney*).

A contagem de leucócitos circulantes fornece parâmetro de relativização da quantidade total de leucócitos em relação ao que está sendo recrutado para a microvasculatura do SNC. Portanto, nosso objetivo com essa contagem foi investigar se os animais exercitados apresentavam valores similares de recrutamento em decorrência da mesma quantidade de células circulantes. E, de fato, não houve diferença entre animais sedentários e exercitados induzidos para EAE quanto à contagem de leucócitos da circulação sistêmica (**Figura 13**).

Quanto a esta dinâmica de circulação, podemos notar um significativo aumento de células em 10 dpi seguido por redução aos 14 dpi, tanto nos animais sedentários quanto nos exercitados induzidos para EAE. É interessante notar, contudo, que os animais exercitados controle apresentaram aumento na quantidade de células circulantes quando analisados em 14 dias, após a injeção de salina, se comparados aos 10 dias após a indução. Este fato está provavelmente associado aos 4 dias de repouso que os animais exercitados foram submetidos

entre 10 e 14 dpi. Ademais, as ausências de diferença entre os grupos EAE nos parâmetros sistêmico e de recrutamento de leucócitos para o SNC, sugerem que o exercício físico prévio não aboliu ou impediu o desenvolvimento da doença e os fatores associados à ativação da resposta imune periférica e local, apesar de ter atenuado sua apresentação clínica.

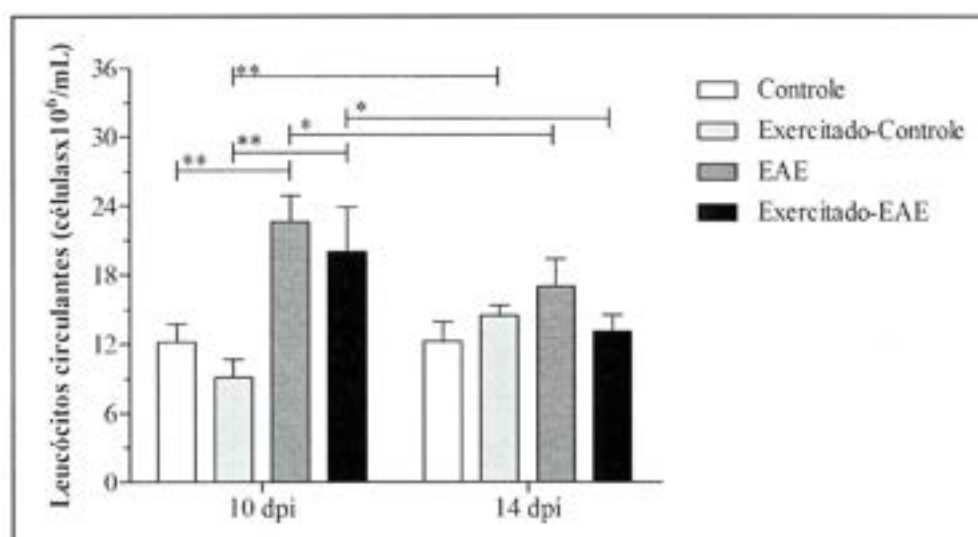


Figura 13. Contagem de leucócitos circulantes em animais controle e EAE em 10 e 14 dpi, sedentários e exercitados. Os dados estão apresentados como média±EPM. Os asteriscos indicam as diferenças observadas entre os animais controle e EAE em 10 dpi, entre 10 e 14 dpi nos animais EAE e controle exercitados ($P<0,05$ pelo teste de *Mann Whitney*).

2. Concentrações de citocinas (TNF, IL-1 β , IL-6 e IL-10) e do Fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) em homogenato de cérebro e medula espinhal

2.1. Considerações iniciais

No intuito de investigar ao papel dos mediadores neuroinflamatórios solúveis sobre a atenuação do escore clínico observado nos animais EAE exercitados, as concentrações de

citocinas foram avaliadas em homogenatos não perfundidos de SNC. Esta análise fornece importantes informações sobre a possível polarização das respostas imunes. O espectro de citocinas estudadas incluiu TNF e IL-1 β (referidas como pró-inflamatórias), IL-6 (referida como reguladora da inflamação) e IL-10 (referida como antiinflamatória).

O BDNF vem sendo associado aos efeitos benéficos do exercício físico para o SNC tais como melhora cognitiva e de memória (Ang e Gomez-Pinilla, 2007; Basso e Hansen, 2011), associado com a atenuação dos sinais clínicos da EAE (De Santi, Annunziata *et al.*, 2009) e sendo reconhecido como um importante mediador molecular na neuroproteção (De Santi, Polimeni *et al.*, 2011; Luhder, Gold *et al.*, 2013). Sendo assim, também investigamos, nos mesmos tecidos utilizados para dosagem de citocinas, a concentração de BDNF.

2.2. Materiais e Métodos

Para este estudo, estão incluídos animais dos grupos S-C (n=8), E-C (n=8), S-EAE (n=9) e E-EAE (n=7) que fizeram parte do grupo total de animais estudados no Capítulo I (experimento "A") e foram mantidos nas mesmas condições experimentais ali referidas. Estes animais foram sacrificados em 14 dias após as injeções de salina e MOG₃₅₋₅₅. Um grupo adicional de 15 animais EAE, sendo 8 sedentários e 7 exercitados, estudados aos 10 dias após a indução estão incluídos neste item. Estes 47 animais são os mesmos utilizados na contagem de células sanguíneas circulantes referidas anteriormente.

Para a mensuração da concentração de citocinas e do BDNF, após a decapitação, o cérebro, a medula espinhal e o músculo gastrocnêmio foram coletados e estocados em nitrogênio líquido. Os dados referentes ao músculo gastrocnêmio foram apresentados no

capítulo II (Tabela 06), sendo que o processamento dos tecidos do SNC seguiu o mesmo protocolo.

As amostras foram homogeneizadas em solução (100 mg/mL) para extração de citocinas. Esta solução foi preparada a partir de uma solução de tampão fosfato (NaCl a 137mM; KCl a 2,7mM; Na_2HPO_4 a 8,1mM; KH_2PO_4 a 1,5mM) em água destilada, contendo: NaCl a 0,4 M, Tween 20 a 0,05%, Albumina de soro bovino (BSA - *Bovine Serum Albumin*) a 0,5%, Fluoreto de fenilmetilsufonila (PMSF- *Phenylmetilsulfonyl fluoride*) a 0.1mM, cloreto de benzetônio a 0,1 mM, EDTA a 10 mM e 20 KI de aprotinina. O homogenato foi centrifugado a 10.000 r.p.m./10 min a 4°C e o sobrenadante recolhido, aliquotado e estocado a -20°C até o uso. As concentrações das citocinas e do BDNF foram avaliadas no sobrenadante do homogenato em diluição 1:3 em PBS contendo 0,1% de soro albumina bovina (BSA) utilizando kits obtidos da R&D Systems (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Estes kits foram utilizados de acordo com os procedimentos previamente descritos pelo fabricante em três etapas (1º dia: plaqueamento; 2º dia: bloqueio; 3º dia: detecção/revelação em absorbância). A concentração referente a cada amostra foi calculada a partir de uma curva padrão correspondente e expressa em pg/mL.

Os dados estão expressos como média e erro padrão da média e foram inicialmente verificados para as possíveis interações entre os efeitos do protocolo de exercício físico regular e da indução da EAE sobre o modelo pela análise de variância de duas vias com teste *post-hoc* de Bonferroni. Comparações múltiplas entre controles e os dois tempos da EAE (10 e 14dpi) foram feitas por análise de variância de uma via com teste *post-hoc* de Tukey. O valor de significância foi estabelecido em $P < 0,05$.

2.3. Resultados

O primeiro resultado que merece atenção é a diferença na concentração de TNF no cérebro ($P<0,001$; Figura 14A) e na medula espinhal ($P<0,05$; Figura 15A) entre os grupos controles. Neste caso, os animais exercitados apresentaram menor quantidade de TNF nos dois compartimentos do SNC, demonstrando um efeito antiinflamatório desta modalidade de exercício. É importante observar que este dado corrobora a menor concentração de TNF muscular apresentada no Capítulo II (Tabela 06). Além disso, deve-se notar que este resultado foi acompanhado de aumento no número de leucócitos circulantes de 10 para 14 dias após a injeção de salina, conforme descrito na Figura 13.

Aprofundando com as análises dos resultados do homogenato de cérebro (Figura 14), verificamos que a análise de variância de duas vias revelou efeito isolado da EAE sobre as quatro citocinas analisadas, sendo **TNF** ($F_{2,34}=27,84$; $P<0,0001$), **IL-1 β** ($F_{2,34}=12,74$; $P<0,0001$), **IL-6** ($F_{2,33}=20,12$; $P<0,0001$) e **IL-10** ($F_{2,34}=12,48$; $P<0,0001$). O exercício isoladamente atuou sobre **TNF** ($F_{1,34}=42,72$; $P<0,0001$), **IL-6** ($F_{1,33}=7,04$; $P=0,0122$) e **IL-10** ($F_{1,34}=11,91$; $P=0,0015$), mas não sobre **IL-1 β** ($F_{1,34}=3,61$; $P=0,0660$). Já a interação entre os dois fatores não existiu para **IL-6** ($F_{2,33}=1,44$; $P=0,2521$), mas aconteceu para **TNF** ($F_{2,34}=9,45$; $P=0,005$), **IL-1 β** ($F_{2,34}=5,34$; $P=0,0096$) e **IL-10** ($F_{2,34}=3,88$; $P=0,0302$).

Já a análise de variância de uma via mostrou de um modo geral, que os animais sedentários apresentaram aumento de todas as citocinas em 10 dpi em relação aos animais sedentários controle. Este resultado foi seguido de uma diminuição nos níveis de TNF, IL-1 β e IL-10, fazendo um paralelo com o que foi observado nos resultados dos leucócitos circulantes (Figura 13). Os animais exercitados EAE também apresentaram aumento de TNF, IL-1 β e IL-6 em 10 dpi quando comparados com os respectivos controles. No entanto, os aumentos foram menos acentuados, e quando comparados aos sedentários EAE, verificamos

menor concentração de TNF ($P<0,001$), IL-1 β ($P<0,01$) e IL-10 ($P<0,001$) nos exercitados. Em 14 dpi, não foram observadas diferenças entre os grupos para estas três citocinas, mas a IL-6 foi menor nos exercitados ($P<0,05$). Aliás, a IL-6 teve um padrão diferente de resposta nos animais sedentários, uma vez que não se reduziu de 10 para 14 dpi.

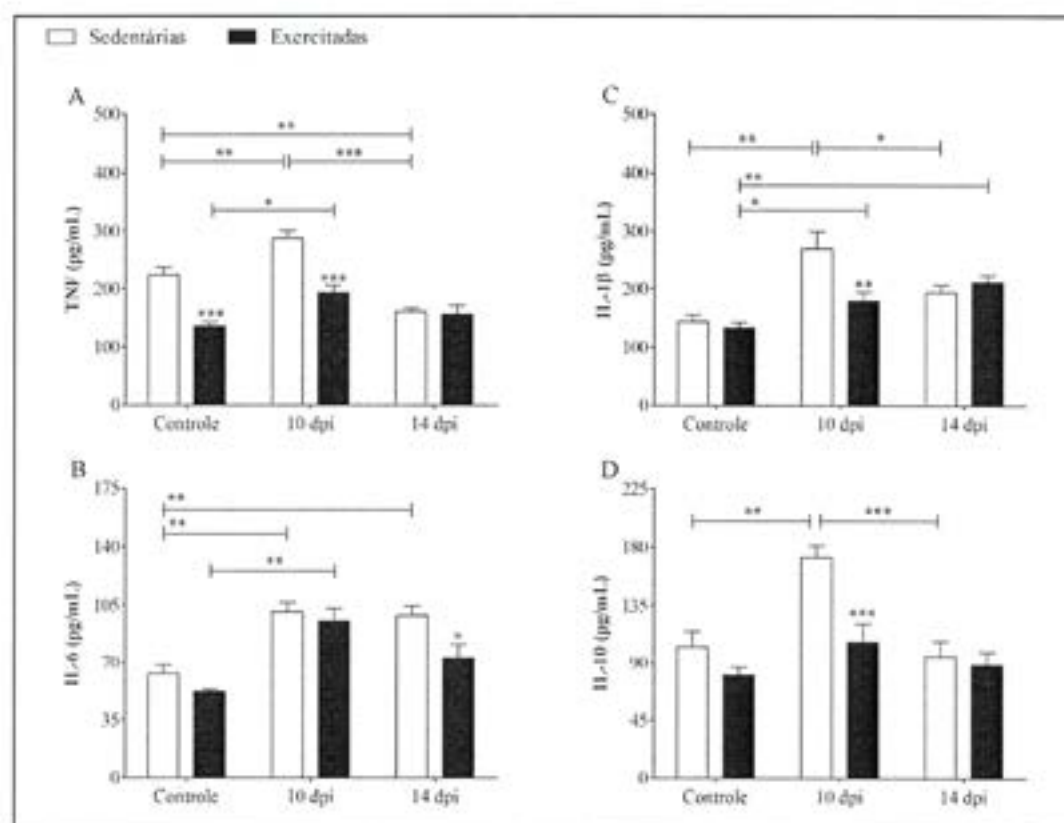


Figura 14. Resultado dos níveis de TNF (A), IL-6 (B), IL-1 β (C) e IL-10 (D) em homogenato de cérebro de animais sedentários e exercitados, controle e EAE (10 e 14 dpi). Os dados estão apresentados como média \pm EPM. Os asteriscos sobre as barras indicam diferenças entre sedentários e exercitados. As linhas indicam diferença entre controle e os dois tempos de EAE.

Na medula espinhal (Figura 15), houve efeito isolado da EAE sobre as quatro citocinas analisadas, sendo TNF ($F_{2,33}=6,26$; $P=0,0049$), IL-1 β ($F_{2,33}=7,00$; $P=0,0029$), IL-6 ($F_{2,31}=5,67$; $P=0,0080$) e IL-10 ($F_{2,32}=3,70$; $P=0,0359$). O exercício isoladamente atuou

apenas sobre **TNF** ($F_{1,33}=18,91$; $P<0,0001$) e **IL-10** ($F_{1,32}=5,61$; $P=0,0241$), com **IL-1 β** ($F_{1,33}=0,01$; $P=0,9303$) e **IL-6** ($F_{1,31}=0,28$; $P=0,6024$) apresentando baixos valores de F. A interação entre os dois fatores, EAE e exercício, teve efeito sobre a significância do modelo nas 4 citocinas analisadas, sendo **TNF** ($F_{2,33}=34,18$; $P<0,0001$), **IL-1 β** ($F_{2,33}=4,88$; $P=0,0139$), **IL-6** ($F_{2,31}=13,10$; $P<0,0001$) e **IL-10** ($F_{2,32}=6,34$; $P=0,0048$).

Assim como para o cérebro, os animais sedentários EAE apresentaram aumento de **IL-6** e **IL-1 β** em 10 dpi se comparados aos controles. No entanto, estas duas citocinas diminuíram em 14 dpi na medula espinhal. Além disso, **TNF** e **IL-10** diminuíram, demonstrando uma diminuição geral das citocinas em animais EAE sedentários aos 14 dpi, se comparados aos 10 dpi, mais uma vez em paralelo com o que foi observado nos leucócitos circulantes (Figura 13). No entanto, os animais exercitados apresentaram um progressivo aumento na concentração de **TNF** e **IL-6** de 10 para 14 dpi. Quando comparados sedentários e exercitados com EAE, os animais exercitados tiveram menores valores de **IL-6** ($P<0,05$) aos 10 dpi, mas maiores valores de **TNF** ($P<0,001$), **IL-6** ($P<0,001$) e **IL-10** ($P<0,001$) aos 14 dpi. É importante notar que essas maiores concentrações de citocinas aos 14 dpi dos animais exercitados não foi acompanhada de maior número de leucócitos circulantes (Figura 13), nem de maior recrutamento de leucócitos na microvasculatura da medula espinhal (Figuras 07 e 08), e nem mesmo de maior infiltrado (Figuras 11 e 12). Em conjuntos, estes dados sugerem efeito específico do exercício e, possivelmente, não associado à interação leucócito-endotélio, do exercício na modulação destas citocinas em animais EAE.

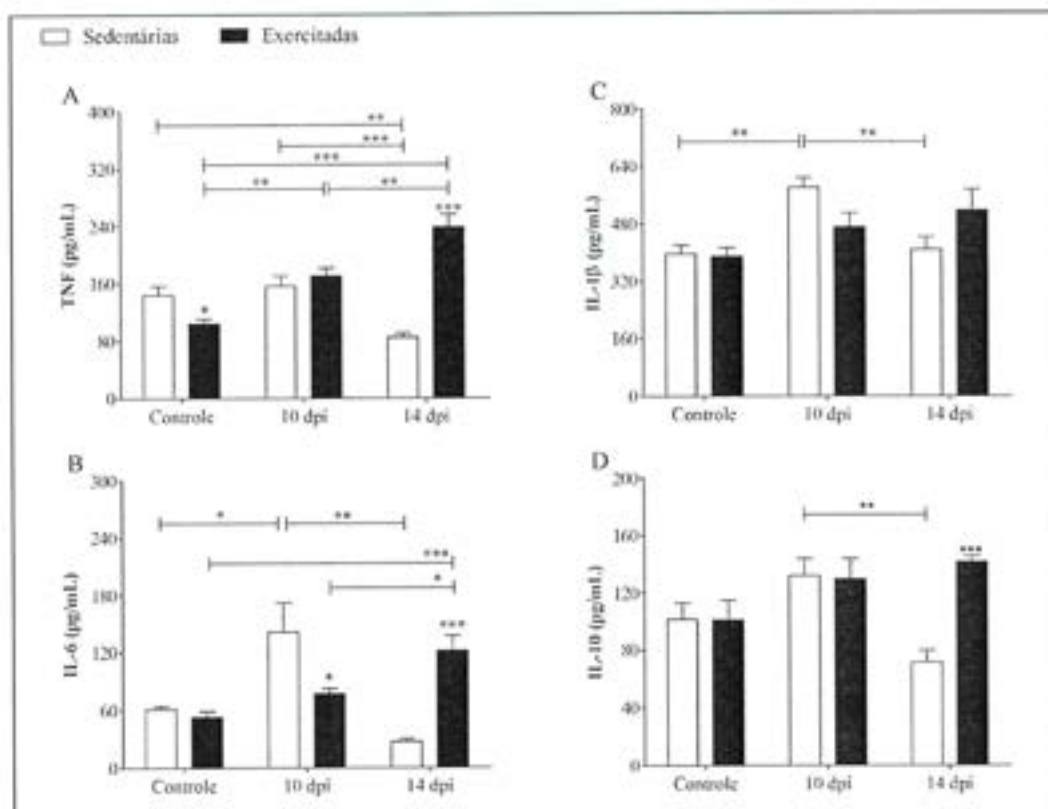


Figura 15. Resultado dos níveis de TNF (A), IL-6 (B), IL-1 β (C) e IL-10 (D) em homogenato de medula espinal de animais sedentários e exercitados, controle e EAE (10 e 14 dpi). Os dados estão apresentados como média \pm EPM. Os asteriscos sobre as barras indicam diferenças entre sedentários e exercitados. As linhas indicam diferença entre controle e os dois tempos de EAE.

Com relação às concentrações de BDNF (**Figura 16**), a análise de variância de duas vias mostrou efeito da EAE tanto no cérebro ($F_{2,32}=5,15$; $P=0,0115$) quanto na medula espinal ($F_{2,33}=23,26$; $P<0,0001$), mas o efeito do exercício isolado somente ocorreu na medula ($F_{1,33}=8,61$; $P=0,0061$). Os dois compartimentos também foram afetados pela interação entre EAE e exercício, sendo $F_{2,32}=13,14$ ($P<0,0001$) para cérebro e $F_{2,33}=10,65$ ($P=0,0003$) para medula.

Sendo assim, houve aumento significativo do BDNF cerebral em 10 dpi (comparado aos controles), seguido de uma redução significativa aos 14 dpi para os animais sedentários, a

semelhança do que ocorreu com as citocinas. No entanto, os animais exercitados apresentaram aumento em 14 dpi apenas, corroborando uma diferença entre os dois grupos tanto em 10 ($P<0,05$), quanto em 14 dpi ($P<0,001$).

Na medula espinhal, os animais sedentários apresentaram como no cérebro, aumento de BDNF em 10 dpi comparado aos controles. Porém, este resultado não foi alterado aos 14 dpi, ou seja, não houve redução significativa apesar da tendência observada no gráfico. Os animais exercitados, a exemplo do que ocorreu com algumas citocinas, apresentaram aumento progressivo na concentração de BDNF de 10 para 14 dpi, novamente corroborando uma diferença entre os dois grupos em 14 dpi ($P<0,001$). Por fim, é interessante notar a diferença na concentração de BDNF entre os animais controle na medula espinhal ($P<0,05$).

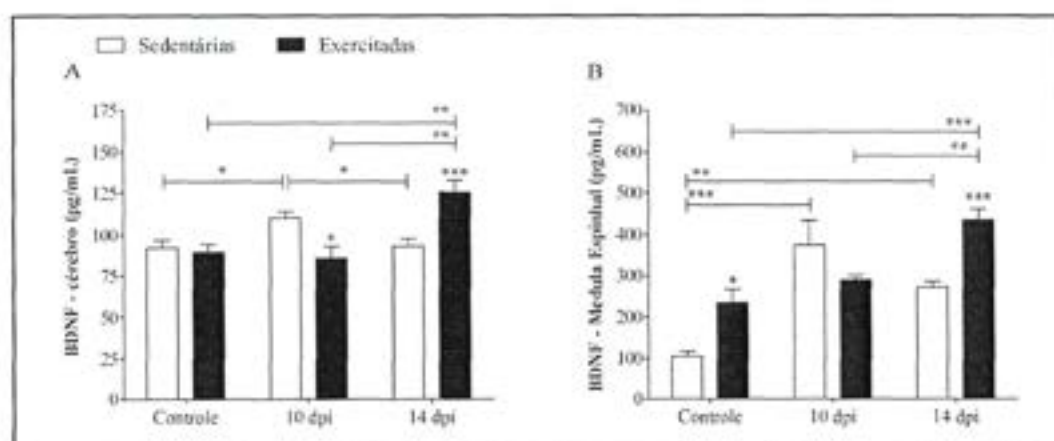


Figura 16. Resultado dos níveis de BDNF em homogenato de cérebro e medula espinhal de animais sedentários e exercitados, controle e EAE (10 e 14 dpi). Os dados estão apresentados como média±EPM. Os asteriscos sobre as barras indicam diferenças entre sedentários e exercitados. As linhas indicam diferença entre controle e os dois tempos de EAE.

**CAPÍTULO IV - Estudo dos efeitos do exercício físico
regular sobre os parâmetros associados à progressão da EAE**

Considerações iniciais sobre o capítulo

Para composição deste quarto e último capítulo, serão apresentados os métodos e resultados encontrados nos estudos realizados entre maio de 2012 e março de 2013 no *Department of Microbiology and Immunology and Neurological Surgery da University of Miami*. Estes estudos fizeram parte do estágio sanduíche de doutoramento pelo Programa Institucional de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) da CAPES.

Os 47 animais utilizados após 42 dias da indução (fase crônica da doença) são os mesmos referidos no experimento “B” do Capítulo I e, portanto, foram mantidos nas mesmas condições experimentais. Um grupo adicional de 23 animais EAE, sendo 12 sedentários e 11 exercitados, estudados nos dias 20-21 dias após a indução (remissão do primeiro surto) estão incluídos. A composição de cada grupo de estudo em cada protocolo será descrita em detalhes nos itens Materiais e Métodos de cada uma das três partes.

A relevância da medula espinhal como sítio anatômico do modelo associada aos resultados conflitantes apresentados nos capítulos anteriores tais como atenuação da resposta clínica sem modificação na quantidade de células recrutadas com aumento das citocinas TNF, IL6 e IL-10 bem como do fator neurotrófico BDNF, motivaram as investigações que serão apresentadas.

Dessa forma, este capítulo tem como objetivo apresentar as alterações associadas à progressão do modelo EAE comparando-se animais sedentários e exercitados quanto às características histopatológicas e moleculares da medula espinhal.

1. Perfil do recrutamento leucocitário na medula espinhal

1.1. Considerações iniciais

O exercício regular é reconhecido por seu papel na redução do risco associado a varias condições patológicas via alterações no balanço energético (Dishman, Berthoud *et al.*, 2006), assim como nas respostas antiinflamatórias sistêmicas (Pedersen e Saltin, 2006; Gleeson, Bishop *et al.*, 2011). Foi demonstrado, por exemplo, que além de reduzir a quantidade de tecido adiposo depositado, o exercício regular em camundongos teve também efeito na diminuição do infiltrado inflamatório para esse tecido e modificou o perfil de células infiltradas, sobretudo com relação ao fenótipo de macrófagos (Kawanishi, Yano *et al.*, 2010). Neste caso, houve uma modificação de macrófagos do tipo M1, pró-inflamatório, para o tipo M2, antiinflamatório.

Conforme observado no capítulo anterior, recrutamento e infiltrado leucocitário para a medula espinhal apresentaram valores similares entre os animais EAE sedentários e exercitados. No entanto, houve maior concentração das citocinas TNF, IL-6 e IL10, sugerindo ou uma contribuição de componentes celulares do sistema nervoso para a produção destas citocinas ou uma modulação da resposta leucocitária pelo exercício prévio. No intuito de aprofundar a investigação sobre essa possível modulação leucocitária que poderia estar associada ao atenuado escore clínico dos animais EAE exercitados, o perfil de células recrutadas para a medula espinhal foi investigada pela técnica de citometria de fluxo.

1.2. Materiais e Métodos

Neste estudo estão incluídos homogenatos de medula espinhal de 25 animais EAE que foram, inicialmente, divididos em Sedentários ($n=13$) e Exercitados ($n=12$) e, após quatro semanas de exercício, receberam injeção com emulsão contendo MOG₃₅₋₅₅. O protocolo de exercício foi mantido até que os animais atingissem 10 dias de indução. Aos 21 dias após a indução, 6 animais S-EAE e 6 E-EAE, foram estudados, sendo o restante analisados aos 42 dias após a indução.

O isolamento dos leucócitos, a marcação dos mesmos e análise destas células marcadas por citometria de fluxo foram realizados seguindo padronização previamente descrita (Brambilla, Persaud *et al.*, 2009). Inicialmente, os animais foram anestesiados por injeção subcutânea de 100 μ L de uma mistura contendo ketamina e xilazina (3:1) e perfundidos transcardialmente por 5-10 minutos com solução tampão fosfato (PBS-phosphate-buffered saline), utilizando-se bomba de perfusão para controle do fluxo em cerca de 500 μ L por minuto. Para auxiliar a remoção do sangue da circulação, eram injetados 50 μ L de heparina no ventrículo esquerdo antes do início da perfusão de PBS. A perfusão foi considerada finalizada quando o fígado dos animais apresentava-se com aspecto claro, indicando ausência de sangue na circulação sistêmica. Após a perfusão, a medula espinhal de cada animal foi coletada com auxílio de uma seringa de 10 mL e colocada em tubo falcon de 15 mL, completados com 5 mL de solução salina balanceada de Hank (HSSB - *Hank's balanced salt solution*). O baço de dois animais foi coletado como controle positivo e processado de modo semelhante à medula espinhal.

Com o auxílio de tubos falcon, filtros de 70 μ m e êmbolos de seringa, os tecidos foram macerados e os homogenatos centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos, à 4°C. O *pelet* foi ressuspensionado com 360 μ L de solução tampão PBS contendo 0,5% de BSA (*bovine*

serum albumin). A seguir, 40 μ L de *Myelin Removal Beads* (MiltenyiBiotec Inc., Auburn, CA, USA) foram adicionados, misturados delicadamente e armazenados a 4°C por 15 minutos para reação. Nesse passo, os componentes associados à mielina foram magneticamente marcados. A solução foi então lavada por adição de 4 mL de solução tampão PBS contendo 0,5% de BSA, centrifugada (12.000 rpm/10 min/ 4°C), sendo o *pelet* ressuspendido com 1 mL de tampão 0,5% de BSA. Este volume foi corrido na coluna magnética (MiltenyiBiotec Inc., Auburn, CA, USA) para remoção dos *debris* de mielina, com adição subsequente de 2 mL de tampão 0,5% de BSA para coleta total dos leucócitos que porventura tenham ficado nas colunas. Os *debris* de mielina frequentemente são associados a uma diminuição da acuracidade da leitura o que exige a confecção de um *pool* de tecidos para contar como um número amostral.

Os 3 mL finais de suspensão sem *debris* de mielina foram centrifugados (12.000 rpm/10 min/ 4°C) e o precipitado ressuspendido com 200 μ L de tampão de citometria de fluxo (*fluorescence-activated cellsorting buffer*, eBioscience, San Diego, CA, USA). Desse volume, 10 μ L foram diluídos em 40 μ L de *Trypan Blue* para contagem das células em câmara de Neubauer, em procedimento semelhante ao descrito no Capítulo III, com relação à contagem total das células circulantes. Com a finalidade de adicionar maior número de marcadores possíveis, o volume restante de tampão com as células foi dividido em dois grupos. Antes da marcação, as células foram incubadas 4°C por 10 minutos com anti-CD16/32 (*FcR block*, eBioscience, San Diego, CA, USA) para evitar marcações inespecíficas. A marcação foi feita por 30 minutos a 4°C.

O primeiro grupo de células, por conter anticorpo para antígeno intracelular (FoxP3), passou por um processo de permeabilização de membrana antes da marcação. A marcação deste grupo incluiu os anticorpos FITC-anti-CD45 (1:300); APC-Cy7-anti-CD4 (1:50); PerCP-Cy 5.5-anti-CD8 (1:200); PE-Cy7-anti-CD25 (1:100) e PE-FoxP3 (1:100). Com esta

marcação foi possível quantificar o recrutamento de células T CD4 (CD45⁺CD4⁺), CD8 (CD45⁺CD8⁺) e regulatórias (CD4⁺CD25⁺FoxP3). O segundo grupo de células recebeu os marcadores FITC-anti-CD45 (1:300); PE-Cy7-anti-CD11b (1:100); APC-AlexaFluor780-anti-B220 (1:200) e PE-anti-NK1.1 (1:200), possibilitando a quantificação de micrógliia (CD45^{low}-CD11b⁺), macrófagos (CD45^{high}-CD11b⁺), células B (CD45⁺ B220⁺) e células *natural killer* (CD45⁺ NK1.1⁺).

As suspensões com as células foram fixadas *overnight* em solução 1% de paraformaldeído a partir do tampão de citometria de fluxo (*fluorescence-activated cell sorting buffer*, eBioscience, San Diego, CA, USA). A leitura das células foi realizada em citômetro de fluxo LSR II equipado com *software* FACS Diva 6.0 (BD Biosciences).

Os dados estão expressos como média e erro padrão da média e foram analisados pelo teste t de *Student* comparando-se os animais EAE sedentários aos exercitados em cada tempo (21 ou 42dpi) para cada tipo de célula analisada. O valor de significância foi estabelecido em $P < 0,05$.

1.3. Resultados

Na **Figura 17**, observamos que a contagem total dos leucócitos recrutados para a medula espinhal, a partir da coloração com *Trypan Blue*, foi de $1.063.000 \pm 164.400$ células nos animais sedentários e $1.369.000 \pm 195.500$ nos exercitados, aos 21 dias após a indução ($P > 0,05$). Aos 42 dias de indução, esse número foi reduzido para 841.400 ± 102.200 células nos animais sedentários ($P > 0,05$) e 542.700 ± 84.390 nos exercitados ($P < 0,01$), com diferença entre os dois grupos ($P < 0,05$). Sendo assim, a redução do número total de células nos animais exercitados aos 42 dpi foi significativa em relação aos exercitados de 21 dpi e aos sedentários

de 42 dpi. Além destas observações com o teste *t* de *Student*, a análise de variância de duas vias demonstrou efeito da interação entre exercício e dias da EAE para o modelo ($F_{1,21} = 4,59$; $P < 0,05$).

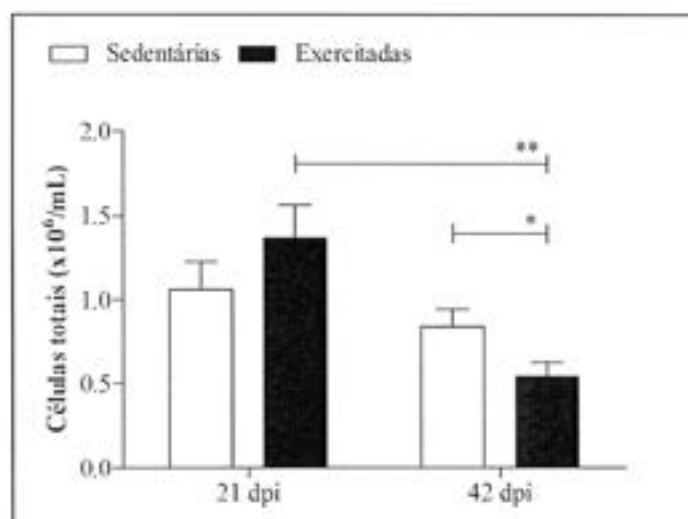


Figura 17. Contagem total de células em suspensão preparada a partir de homogenato de medula espinhal de animais EAE sedentários e exercitados estudados em 21 e 42 dpi. Os dados estão apresentados como média±EPM. Os asteriscos indicam as diferenças observadas entre os animais exercitados de 42 dpi em relação aos exercitados de 21 dpi ($P < 0,01$) e aos sedentários de 42 dpi ($P < 0,05$). 6-7 animais/grupo.

Em continuação, procedemos com as análises do perfil de recrutamento de leucócitos para a medula espinhal. Inicialmente, identificou-se a porcentagem de células marcadas para CD45 (CD45⁺ *singlet*) em cada grupo e com os dados de contagem, calculamos o total destas células recrutadas (**Tabela 7**). A partir destes valores, foram identificadas as porcentagens e os valores absolutos para CD4 e CD8 no primeiro grupo de marcações. A partir dos dados de CD4, foram calculados os dados de células T regulatórias. Ainda, com os valores totais de CD45 no segundo grupo de marcações, foram identificadas as porcentagens e os valores numéricos para micróglia, macrófagos, células B e células *natural killer*.

Tabela 07 – Porcentagem e número total de células marcadas para CD45 em diferentes tempos (21 e 42 dpi), dos animais EAE sedentários e exercitados. Os dados estão apresentados como média e erro padrão da média (\pm) de 6-7 animais/grupo.

Grupos de células	Sedentárias		Exercitadas	
	CD45 ⁺ (%)	Em números	CD45 ⁺ (%)	Em números
21 dpi				
Grupo I	0,16 \pm 0,05	1.739 \pm 559	0,25 \pm 0,11	2.602 \pm 1.034
Grupo II	1,30 \pm 0,46	13.440 \pm 4.990	1,01 \pm 0,36	11.790 \pm 4.077
42 dpi				
Grupo I	1,21 \pm 0,25	9.309 \pm 1.457	1,24 \pm 0,28	5.947 \pm 900
Grupo II	3,26 \pm 1,43	25.264 \pm 8.688	3,55 \pm 2,26	16.382 \pm 7.613

Ao analisarmos os dados brutos da citometria, utilizando-se os valores de porcentagem parental, verificamos que tanto em 21 (**Figura 18**) quanto em 42 dpi (**Figura 19**), não houve diferença entre animais sedentários e exercitados quanto ao perfil percentual das células recrutadas para a medula espinhal. No entanto, quando os valores são expressos como números totais de células, verificamos uma tendência de aumento de células T *natural killer* (CD45⁺ NK1.1⁺; 153% de aumento; P=0,17) e regulatórias (CD4+CD25+FoxP, 74% de aumento; P=0,33) em 21 dpi (**Figura 20**) nos animais exercitados em relação aos sedentários. Por outro lado, houve redução significativa no número de células B (CD45⁺ B220⁺; 36% menos; P<0,01), células CD4 (CD45⁺CD4⁺; 30% menos; P<0,05) e CD8 (CD45⁺CD8⁺; 64% menos; P<0,05) em 42 dpi (**Figura 21**).

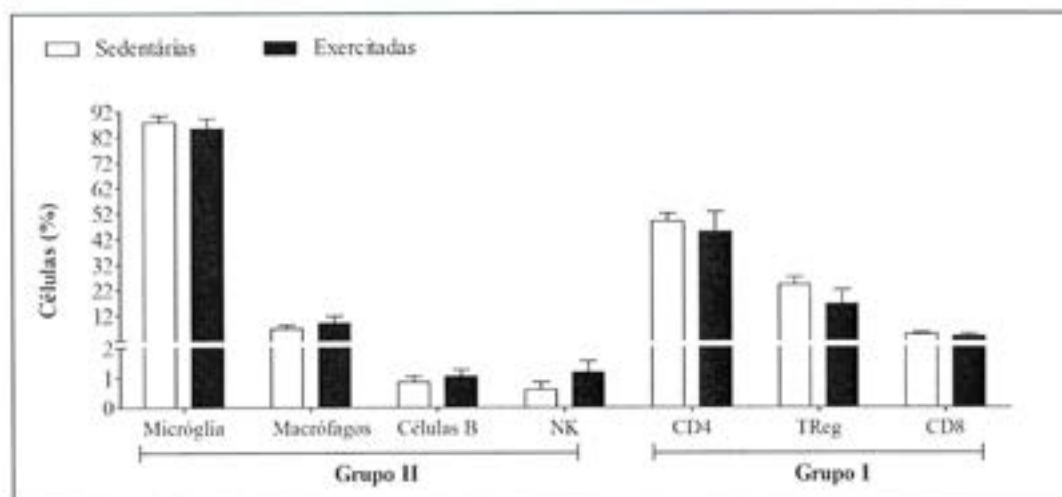


Figura 18. Perfil percentual de células recrutadas para a medula espinhal de animais EAE sedentários e exercitados e analisados aos 21 dpi. Os dados estão apresentados como média±EPM de 6 animais/grupo. Legenda: NK – células *natural killer*; TReg - células T regulatórias.

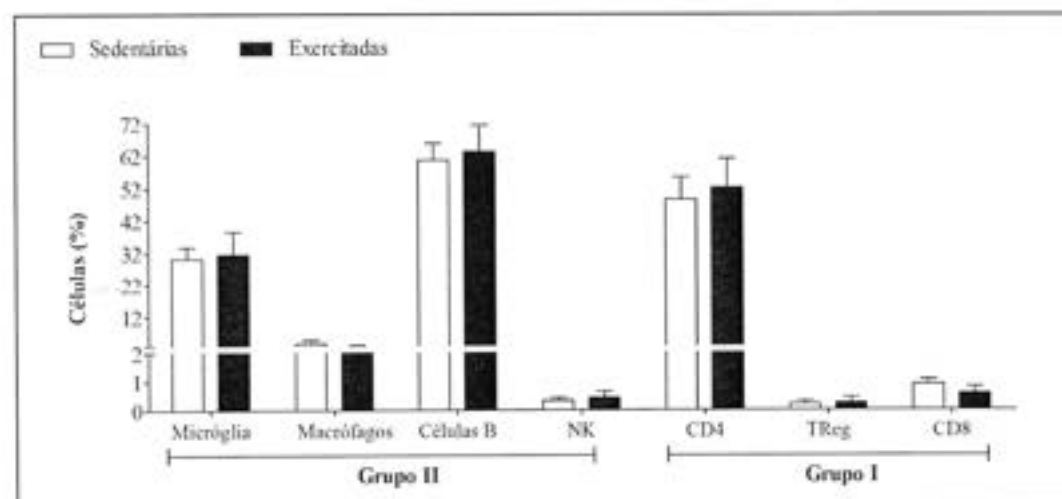


Figura 19. Perfil percentual de células recrutadas para a medula espinhal de animais EAE sedentários e exercitados e analisados aos 42 dpi. Os dados estão apresentados como média±EPM de 6-7 animais/grupo. Legenda: NK – células *natural killer*; TReg - células T regulatórias.

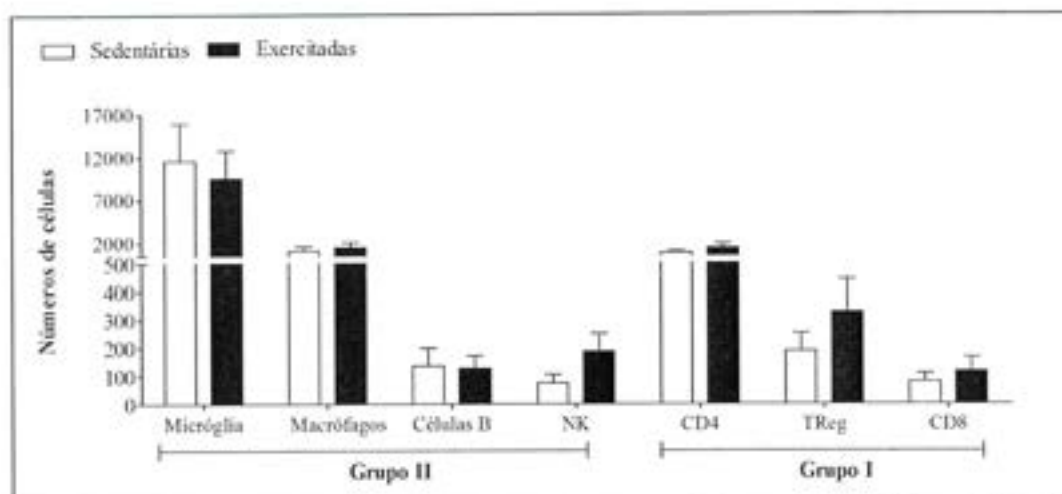


Figura 20. Valores absolutos do perfil de células recrutadas para a medula espinhal de animais EAE sedentários e exercitados e analisados aos 21 dpi. Os dados estão apresentados como média±EPM de 6 animais/grupo. Legenda: NK – células *natural killer*; TReg – células T regulatórias.

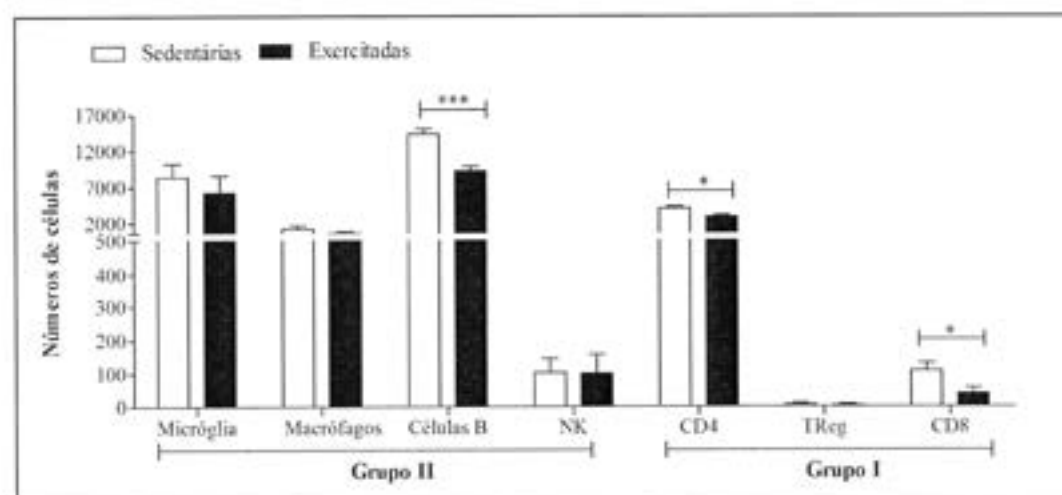


Figura 21. Valores absolutos do perfil de células recrutadas para a medula espinhal de animais EAE sedentários e exercitados e analisados aos 42 dpi. Os dados estão apresentados como média±EPM de 6-7 animais/grupo. Os asteriscos indicam diferença entre animais sedentários e exercitados ($P < 0,05$) pelo teste t de *Student*. Legenda: NK – células *natural killer*; TReg – células T regulatórias.

2. Análise dos fatores associados à desmielinização na medula espinhal

2.1. Considerações iniciais

Em uma revisão sobre efeitos do exercício físico no SNC, sugeriu-se que o fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) produzido tanto periférica quanto centralmente em resposta ao exercício físico, pode regular benéficamente os mecanismos relacionados à aprendizagem e memória, à proliferação e neurogênese e à angiogênese (Cotman, Berchtold *et al.*, 2007). Anteriormente, havia sido demonstrado que a administração periférica e central de IGF-1 em ratos Lewis com EAE promoveu aumento nos níveis de mRNA de proteínas da mielina, tais como a proteína básica da mielina (MBP) e o proteolípido (PLP) (Yao, Liu *et al.*, 1996). Perda reduzida de neurônios motores bem como de oligodendrócitos em animais exercitados, que eram geneticamente modificados para o desenvolvimento da esclerose lateral amiotrófica, foi observada recentemente (Deforges, Branchu *et al.*, 2009). Estes fatos sugerem que o exercício físico regular poderia promover alterações moleculares responsáveis pela oligoproteção com menor dano à mielina.

2.2. Materiais e Métodos

Foram analisados 41 animais EAE inicialmente divididos em Sedentários (n=21) e Exercitados (n=20) que receberam injeção com emulsão contendo MOG₃₅₋₅₅, após quatro semanas de exercício. O exercício foi mantido até que os animais atingissem 10 dpi e, aos 20 dpi, 6 animais sedentários e 5 exercitados foram sacrificadas para análise das alterações moleculares (conteúdo de proteína). Dos 15 animais sedentários restantes, 6 foram avaliados

quanto às alterações moleculares e 9, quanto às alterações histopatológicas e celulares (imunohistoquímica) em 42-43 dpi. Para os exercitados, foram utilizados 10 e 5 animais, respectivamente. Estas análises foram realizadas conforme descrito anteriormente (Brambilla, Ashbaugh *et al.*, 2011) e serão detalhadas a seguir.

Além destes animais, os tecidos dos animais EAE em 14 dpi fixados e incluídos em parafina utilizados para coloração de HE no Capítulo III, foram estudados adicionalmente quanto às alterações histopatológicas no *Department of Microbiology and Immunology and Neurological Surgery, University of Miami*.

Para as análises histopatológicas e celulares por imunohistoquímica (42 dpi), os animais foram anestesiados por injeção subcutânea de 100µL de uma mistura contendo ketamina e xilazina (3:1) e perfundidos transcardialmente por 5-10 minutos com PBS, conforme descrito anteriormente. Em seguida, os animais foram perfundidos por cerca de 20 minutos com paraformaldeído (PFA) 4% em PBS, pH 7,4. A medula espinhal foi dissecada e pós-fixada em PFA 4% por duas horas. Após este procedimento, a medula espinhal foi dividida em duas porções, sendo uma parte incluída em parafina (porção tóraco-lombar) e outra criopreservada em solução de 25% de sacarose em PBS, pH 7,4 (porção cervical-torácica).

A porção da medula espinhal incluída em parafina bem como os tecidos parafinizados provenientes dos animais 14 dpi foram seccionados em cortes transversais de 10µm usando-se micrótomo (Leica, Germany) em séries 1:10 (distância de 100µm) e montadas em lâminas silamizadas. Para quantificar a área de desmielinização da substância branca, duas lâminas de cada animal, sendo uma de cada série, foram coradas pela técnica de *Luxol Fast Blue* e contra coradas com HE. Os cortes foram visualizados em microscópio óptico (Olympus BX41) e analisados por princípios de Cavalieri, utilizando-se o *software* Stereo investigator (Micro Bright Field, Inc.) acoplado ao microscópio.

Os tecidos criopreservados foram seccionados em criostato (Leica CM 1900; Wetzlar, Germany), transversalmente (30 μ m), em séries 1:10. Estes cortes foram montados em lâminas silamizadas e armazenados em freezer -20°C. Para as marcações imunohistoquímicas, as lâminas foram retiradas do freezer e mantidas a temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, lavadas em PBS e bloqueadas por uma hora em temperatura ambiente com soro de cabra (*normal goat serum* - NGS) 5% em PBS acrescidas de 0,4% de Triton-X. A mesma solução base (5% NGS em PBS, 0,4% Triton-X) foi usada para preparo dos anticorpos primários, os quais foram incubados com os tecidos *overnight*, a -4°C. Os anticorpos primários usados foram **CC1** (camundongo, concentração 1:500; Calbiochem-OP80, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) e **PDGFR- α** (coelho, concentração 1:200; Santa Cruz, sc-338). No dia seguinte, as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas por uma hora em temperatura ambiente com os anticorpos secundários conjugados com *Alexa-Fluor* (488-*Goat anti-mouse* para CC1 e 594-*Goat anti-rabbit* para PDGFR- α). As lâminas marcadas para PDGFR- α foram adicionalmente incubadas por uma hora em temperatura ambiente com anticorpo anti-NG2 conjugado com 488- *Alexa-Fluor* (coelho, concentração 1:500; Chemicon- AB5320; Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). Em seguida, as lâminas foram lavadas, cobertas com laminulas e armazenadas a -4°C para posterior quantificação.

A imunoreatividade foi visualizada em microscópio de fluorescência ZeissAxiovert 200 M, sendo as células positivas para CC1 (oligodendrócito maduro) e para PDGFR- α / NG2 (célula progenitora de oligodendrócito) quantificadas por princípios estereológicos utilizando-se o *software* Stereo investigator (Micro Bright Field, Inc.) acoplado ao microscópio. Neste caso, lâminas com 5 cortes de medula espinhal, em intervalos de 300 μ m, espessura de 30 μ m, e marcadas para os anticorpos mencionados eram analisadas e as células contadas manualmente em aumentos de 100x (CC1) ou 63x (NG2/PDGFR α). Ao final, obteve-se o

número total de células por mm^3 . Foi feito um teste antes de se iniciar a contagem com o objetivo de se obter menor coeficiente de erro de Gundersen possível ($<0,1$). Para isto, o tamanho do frame de contagem para CC1 foi de $35 \times 35 \mu\text{m}$ e o *grid layout* foi de $190 \times 190 \mu\text{m}$, sendo contados cerca de 35-40 frames na substância branca e 15-20, na cinzenta. Para a contagem de NG2/PDGFR α , os frames foram de $60 \times 60 \mu\text{m}$ com *grid layout* de 180×180 , sendo contados cerca de 40-45 frames na substância branca e 20-25, na cinzenta.

Para as análises da quantidade de proteína em 20 e 43 dpi, os animais foram anestesiados e perfundidos com PBS, conforme descrito anteriormente. A medula espinhal foi rapidamente coletada e colocada em nitrogênio líquido, para posterior armazenamento em -80°C . Para extração das proteínas totais, os tecidos foram retirados do freezer e mantidos em gelo durante os procedimentos. Inicialmente, amostras foram homogeneizadas em tampão de lise ($300 \mu\text{L}/\text{amostra}$) preparado a partir de solução de tampão fosfato e contendo, por 10mL : 1% de desoxicolato de sódio; 1% de NP-40 (igepal); NaCl a $0,15\text{M}$; fosfato de sódio a $0,01\text{M}$ com pH 7,2; SDS a $0,1\%$; EDTA a 2mM ; $100 \mu\text{L}$ de inibidores de protease (Roche Diagnostics, 11697498001) e $100 \mu\text{L}$ de inibidores de fosfatase (Sigma, P5726). O homogenato foi mantido em *agitação* orbital por duas horas, -4°C , e centrifugado a $15.000 \text{ r.p.m.}/15 \text{ min}$, -4°C . Em seguida, o sobrenadante foi recolhido para dosagem de proteína pelo método de Lowry, aliquotado e estocado a -20°C até o uso.

As proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida e transferidas para uma membrana de nitrocelulose, que foi bloqueada *overnight*, -4°C em solução 5% de leite em PBS 1X. A mesma solução base foi usada para preparo dos anticorpos primários que também reagiram *overnight* a -4°C . Os anticorpos primários usados neste estudo foram: proteolípideo (PLP; coelho, diluição 1:400, Pierce-PA3150), β -tubulina (camundongo, diluição 1:10.000, BDBiosciences), proteína básica da mielina (MBP; rato, diluição 1:1000, Chemicon-MAB386; Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) e gliceraldeído-3-fosfato

Com relação às proteínas estudadas, não observamos qualquer diferença entre sedentárias e exercitadas para MBP, contudo houve maior concentração de PLP no grupo exercitado em ambos os momentos (20 e 43 dpi). A **Figura 28** apresenta os dados de PLP e a **Figura 29**, MBP.

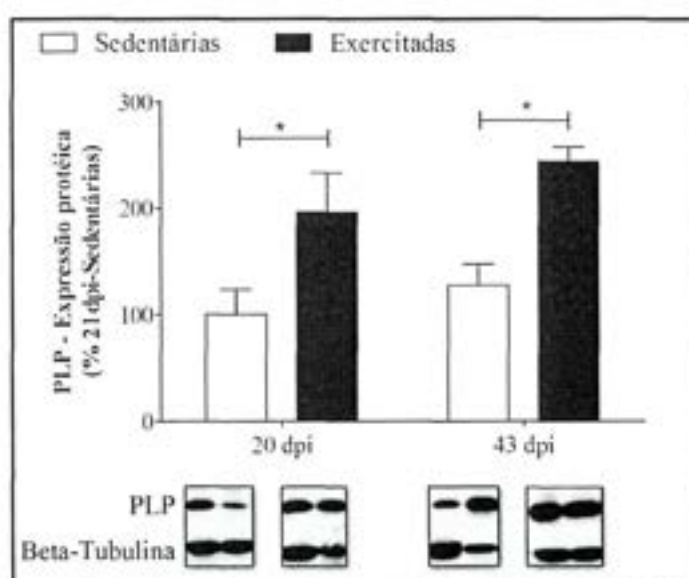


Figura 28. Níveis de PLP em homogenato de medula espinhal de animais EAE sedentários e exercitados analisados aos 20 e 43 dpi. Os dados estão apresentados como média±EPM de 5-6 animais/grupo. Os asteriscos sobre as barras indicam diferenças entre sedentários e exercitados ($P < 0,05$ pelo teste t de Student).

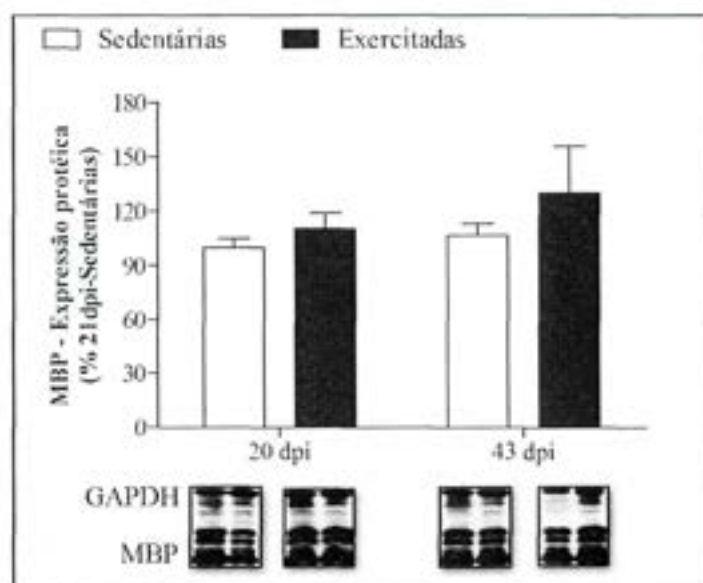


Figura 29. Níveis de MBP em homogenato de medula espinhal de animais EAE sedentários e exercitados analisados aos 20 e 43 dpi. Os dados estão apresentados como média±EPM de 5-6 animais/grupo.

3. Análise dos fatores associados ao dano axonal na medula espinhal

3.1. Considerações iniciais

O dano axonal é proposto como sendo associado aos prejuízos funcionais permanentes da Esclerose Múltipla. Neste caso, tem sido sugerida uma relação entre dano axonal e os processos de desmielinização, uma vez que foram observados que os oligodendrócitos mantidos vivos tentam continuamente remielinizar os axônios desmielinizados, mas que os axônios já desmielinizados são seccionados e os danos permanentes tornam-se evidentes na Esclerose Múltipla (Trapp, Peterson *et al.*, 1998) e no modelo EAE (Wujek, Bjartmar *et al.*, 2002). Por outro lado, tem-se sugerido papel do BDNF na neuroproteção associada ao modelo (De Santi, Polimeni *et al.*, 2011; Luhder, Gold *et al.*, 2013), pois foi observada atenuação dos sinais clínicos em animais EAE tratados com BDNF

(De Santi, Annunziata *et al.*, 2009). Sendo assim, tendo em vista nossos resultados de atenuação dos sinais clínicos associados ao maior conteúdo de BDNF medula na fase aguda e com menor volume de desmielinização na fase crônica, torna-se relevante investigar o perfil do dano axonal nos animais EAE previamente exercitados.

3.2. Materiais e Métodos

Para esta análise, utilizamos o anticorpo contra o neurofilamento desfosforilado, SMI-32, um marcador reconhecido para dano axonal, uma vez que este se acumula em axônios danificados.

Na imunohistoquímica, analisamos os tecidos parafinizados em 14 dpi e os tecidos congelados de 42 dpi. Em ambos os casos, os tecidos foram seccionados em cortes transversais de 10µm em séries 1:10 (distância de 100µm). Os tecidos parafinizados foram inicialmente desparafinizados e tratados para recuperação antigênica por aquecimento com Citrato de Sódio, pH 6,0. Em seguida, os dois tipos de lâminas foram processados conjuntamente para os procedimentos imunohistoquímicos, conforme descrito anteriormente, utilizando-se o anticorpo primário contra SMI-32 (Camundongo, 1:500, Covance) que reagiu *overnight* a -4°C. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas por uma hora em temperatura ambiente com anticorpo secundário conjugado com *Alexa-Fluor* (488-*Goat anti-mouse*). Em seguida, as lâminas foram lavadas, cobertas com laminulas e armazenadas a -4°C para posterior documentação. A imunoreatividade foi visualizada em microscópio de fluorescência ZeissAxiovert 200 M e observadas qualitativamente quanto a presença ou ausência de marcação, indicativa de dano axonal.

Para a quantificação da quantidade da proteína SMI-32, foram utilizados os mesmos tecidos da análise de PLP e MBP e, portanto, tratados nas mesmas condições. Neste caso, porém, a membrana foi incubada *overnight*, a -4°C , com anticorpo primário contra SMI-32 (Camundongo, 1:1000, Covance). A normalização foi realizada com β -tubulina e os dados estão expressos como percentual do grupo sedentário (20 dpi), como média e erro padrão da média sendo analisados pelo teste t de *Student*. O valor de significância foi estabelecido em $P < 0,05$.

3.3. Resultados

A **Figura 30** representa cortes de medula espinhal marcada para SMI32. De modo similar ao que observamos para o volume de desmielinização, podemos notar aumento gradativo do dano axonal (aumento da marcação para SMI32) entre a fase aguda (14 dpi) e crônica da doença (42 dpi), sobretudo entre os animais sedentários (comparação das fotos A-B com as fotos C-D). Podemos observar também a menor progressão do dano axonal entre os animais exercitados (comparação das fotos E-F com as fotos G-H).

Em cérebros dos pacientes, essa marcação foi observada em linhas e pontos indicando orientações longitudinais e transversas dos axônios (Trapp, Peterson *et al.*, 1998). Em nosso estudo, podemos observar os pontos verdes, indicando a orientação obviamente transversa, uma vez que usamos cortes de medula espinhal para as marcações.

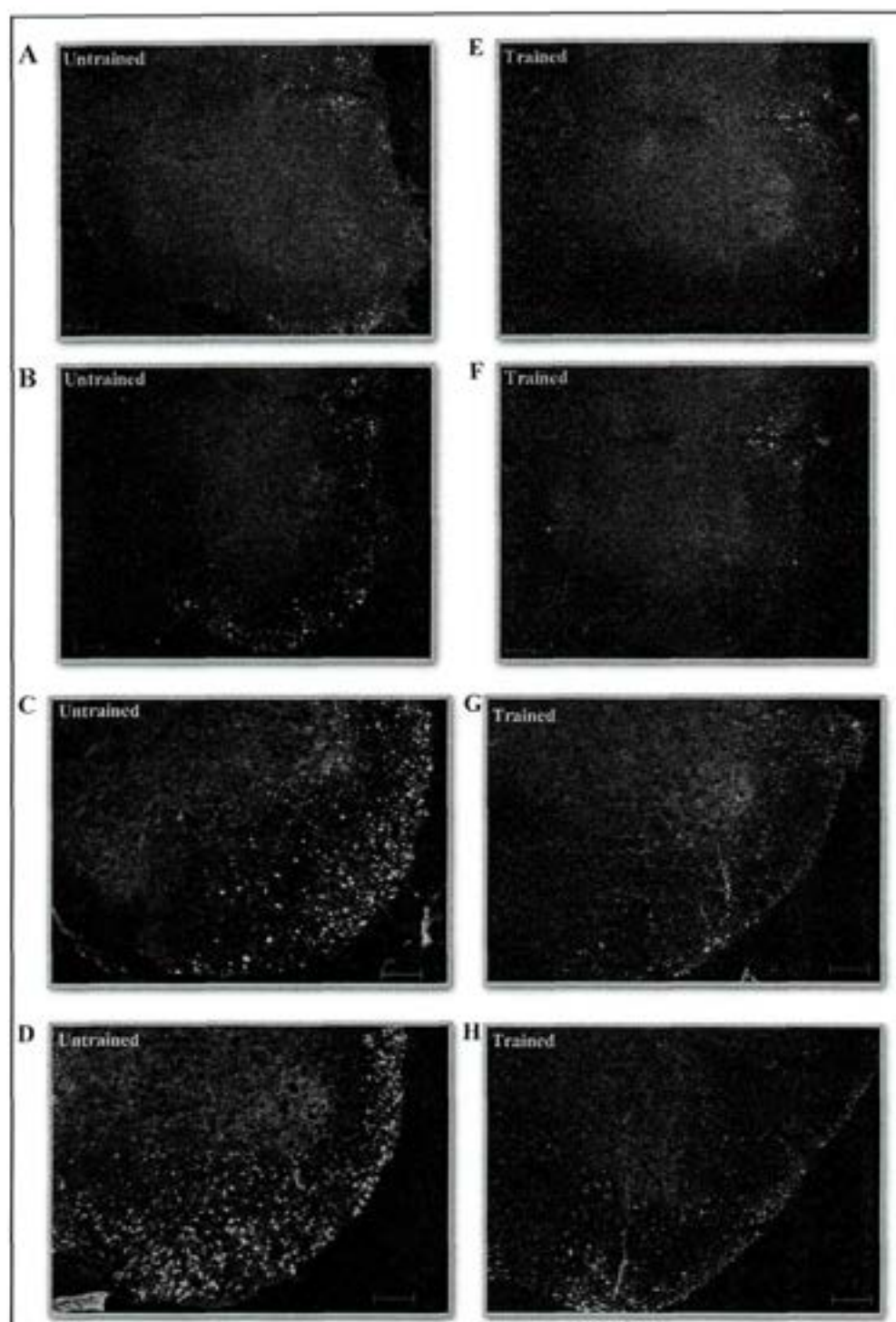


Figura 30. Caracterização do dano axonal (marcação com SMI-32) em cortes de medula espinhal de animais EAE sedentários e exercitados em 14 e 42 dpi. São apresentadas duas fotos representativas de cada grupo, sendo: A-B para animais sedentários EAE de 14 dpi; C-D para animais sedentários EAE de 42 dpi; E-F para animais exercitados EAE de 14 dpi; G-H animais exercitados EAE de 42 dpi.

É evidente também nesta figura 30, a menor marcação para dano axonal nos animais exercitados em relação aos sedentários aos 42 dpi. Estes resultados foram confirmados pela quantificação protéica de SMI-32, conforme se observa na **Figura 31**.

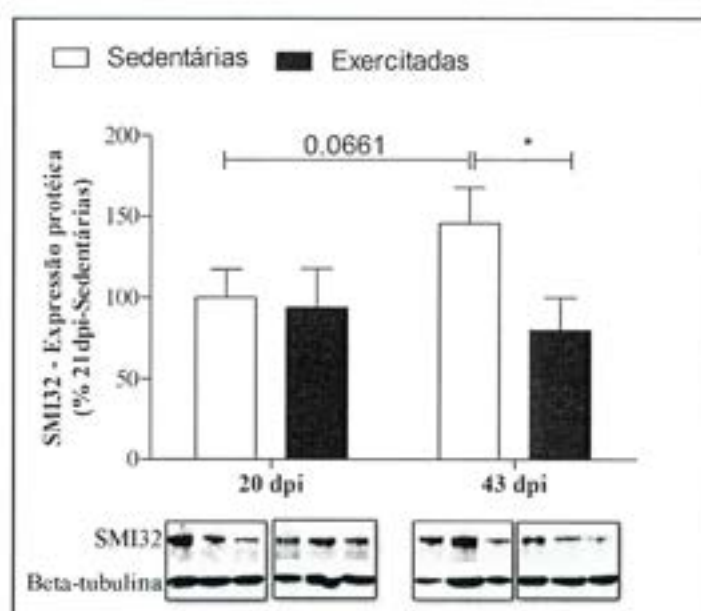


Figura 31. Níveis de SMI-32 em homogenato de medula espinhal de animais EAE sedentários e exercitados analisados aos 20 e 43 dpi. Os dados estão apresentados como média±EPM de 5-6 animais/grupo. O asterisco indica a diferença entre os animais EAE sedentários e exercitados aos 43 ($P < 0,05$ pelo teste t de *Student*).

O objetivo geral do presente estudo foi analisar o desenvolvimento e a progressão da Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE) induzida por MOG₃₅₋₅₅ em camundongos C57Bl/6J submetidos previamente ao exercício físico forçado de natação. A importância deste estudo baseia-se na investigação de possíveis mecanismos associados aos efeitos protetores do exercício físico, os quais podem auxiliar na determinação de novas estratégias terapêuticas na Esclerose Múltipla. No Capítulo I, nossos dados mostraram significativa atenuação do escore clínico. Estes resultados corroboram, em parte, dados da literatura que têm mostrado atenuação dos sinais clínicos de animais EAE exercitados (Le Page, Ferry *et al.*, 1994; Le Page, Bourdoulous *et al.*, 1996; Rossi, Furlan *et al.*, 2009). Por outro lado, nosso trabalho mostra de forma inovadora que seis semanas de exercício regular realizado antes do desenvolvimento da EAE é capaz de atenuar a apresentação clínica da doença.

Ratos Lewis machos e fêmeas apresentando EAE induzida com homogenato de medula espinhal foram exercitados do dia 0 ao dia 10 pós-indução, sendo que foi verificado atraso no primeiro surto, sem afetar a gravidade da doença, ou a apresentação dos surtos seguintes ou mesmo os outros padrões clínicos observados, agudo e monofásico (Le Page, Ferry *et al.*, 1994). Em outro estudo, ratas Lewis com EAE induzida passivamente através da transferência de células T ativadas para MBP foram exercitados por 02 dias em esteira por 250-300 minutos antes e depois da indução e apenas o realizado após a indução teve efeito em atrasar a apresentação clínica da doença (Le Page, Bourdoulous *et al.*, 1996). Mais recentemente, 10 dias de exercício em esteira realizados antes da indução ativa em ratos Lewis não surtiram efeito sobre a apresentação clínica da EAE (Patel e White, 2013).

Por outro lado, foi demonstrado que várias modalidades de estresse crônico como contenção e choques elétricos administrados por mais de 1 hora e durante 5 dias antes e após a indução da EAE atenuaram o curso clínico da doença (para uma revisão, ver Heesen, Gold *et*

al., 2007). Tomados em conjunto, estes dados sugerem que o exercício promoveria mecanismos neuroinflamatórios diferentes dos desencadeados pelos protocolos de stress no modelo EAE. No entanto, é importante ressaltar que o protocolo de exercício físico deve ser realizado por períodos superiores há três semanas para demonstrar capacidade de produzir resposta atenuada ao estresse em ratos cronicamente tratados com dexametasona (Sigwalt, Budde *et al.*, 2011).

Recentemente foi demonstrado que exercício forçado em esteira administrado por 03 semanas antes e mantido por um período semelhante após a indução do modelo de neurite autoimune experimental (EAN) atenuou a gravidade da doença por todo o período estudado, sendo este resultado associado à menor concentração de corticosterona no momento da indução (Calik, Shankarappa *et al.*, 2012).

Em uma linha de raciocínio similar, os efeitos da corrida voluntária realizada logo após a indução ativa por injeção de MOG₃₅₋₅₅ em camundongos fêmeas C57Bl/6J promoveu atenuação dos sinais clínicos entre 12 e 50 dpi (Rossi, Furlan *et al.*, 2009). Neste caso, os animais foram exercitados por 50 dias ao todo, mas a apresentação clínica iniciou-se precocemente em relação à janela temporal descrita na literatura para atenuação da resposta ao estresse pelo exercício. Além disso, os animais continuaram se exercitando por todo o período observado como no caso do estudo anterior com EAN.

Tendo em vista estas informações, propomos neste estudo um protocolo de exercício que incluísse o tempo necessário para adaptação ao estresse antes da indução. Nossa proposta foi testar a hipótese de que as adaptações promovidas pelo programa prévio de exercício regular poderiam interagir com as respostas neuroimunopatogênicas da doença e modificar o curso da mesma. Sendo assim, é a primeira vez que os efeitos interativos entre uma aptidão física prévia e os marcadores biológicos da EAE são investigados. Um dado interessante do nosso estudo é a apresentação de uma resposta clínica atenuada também na fase crônica da

doença (Figura 05), similar ao que foi observado com a corrida voluntária que foi realizada por todo o período de EAE (Rossi, Furlan *et al.*, 2009).

Mas nossos resultados contrastam com os estudos de curtos períodos de exercício (Le Page, Ferry *et al.*, 1994; Le Page, Bourdoulous *et al.*, 1996), uma vez que a apresentação clínica naqueles casos foi apenas atrasada e os animais exercitados apresentaram resultados similares aos sedentários após o pico da doença. No entanto, além do tempo de adaptação ao estresse já mencionado, duas outras importantes diferenças experimentais devem ser levadas em consideração.

Em primeiro lugar, os modelos de indução são diferentes e o modelo de EAE em ratos Lewis apresenta-se por ser predominantemente inflamatório com poucas ou raras lesões desmielinizantes (Shin, Ahn *et al.*, 2012). Em segundo, o protocolo de exercício utilizado, esteira versus natação. O fato é que a natação mostrou-se mais benéfica do que o exercício em esteira no modelo de esclerose lateral amiotrófica (Deforges, Branchu *et al.*, 2009).

Assim, as discrepâncias observadas entre o presente estudo e os dados prévios da literatura, levantam novas questões. São de fato diferentes as respostas provocadas pelos protocolos de estresse e exercício no EAE? Se o forem, quais os mecanismos envolvidos em cada tipo de resposta? O ambiente de realização do exercício, água ou solo, interfere na resposta especificamente associada à EM e ao EAE? Seriam diferentes também as respostas neuroimunopatogênicas ao exercício nos diversos tipos de modelo EAE? Quanto tempo de exercício é de fato necessário para promover respostas clínicas favoráveis? Quais as implicações dessas diferenças na prática clínica?

As respostas a estas perguntas somente podem ser conseguidas com a realização de mais estudos e elas dariam suporte para elaboração de programas de prescrição de exercícios relacionados ao auxílio no tratamento da EM.

Reforçando os dados de atenuação do escore clínico, também foi observado atenuação da perda de massa corporal (Figuras 03 e 06), os quais são corroborados pelo estudo de exercício voluntário (Rossi, Furlan *et al.*, 2009). Além disso, podemos sugerir que reduções de massa adiposa e muscular (Tabela 06) contribuíram conjuntamente para a redução da massa corporal nos animais EAE. Entretanto, apesar da atenuação da perda de massa corporal, o exercício físico regular prévio não foi capaz de modular significativamente as respostas metabólicas e teciduais sistêmicas da fase aguda associadas ao modelo.

Não encontramos outros estudos que tenham avaliado adiposidade de animais EAE. No entanto, a análise da composição lipídica plasmática na EM, sobretudo durante o surto, revelou redução plasmática de fosfolípidos (Montfoort, Baker *et al.*, 1966), dos ácidos palmítico e esteárico dos ésteres de colesterol (Cumings, Shortman *et al.*, 1965) e do próprio colesterol (Cendrowski, Szajbel *et al.*, 1968), corroborando nossos dados.

Foi demonstrado que o constante trabalho muscular proporcionado pelo exercício físico regular aumenta a produção de IL-6 pelo músculo a cada sessão e efeito levaria a uma inibição na produção muscular e sérica de TNF (Pedersen e Hoffman-Goetz, 2000; Pedersen e Saltin, 2006). Sugere-se que essa resposta associada ao metabolismo oxidativo muscular aumentado em decorrência do treinamento possam atuar na minimização da perda de massa muscular (Argiles, Busquets *et al.*, 2012).

O conteúdo de glicogênio corporal é importante ferramenta para se medir capacidade oxidativa, uma vez que esta reserva contribui para fornecer aporte de carboidratos que podem ser mobilizados em contínuas sessões de exercício físico (Mcardle, Katch *et al.*, 1998; Bernardes, Manzoni *et al.*, 2004). Alguns dos mecanismos responsáveis por essa melhora no metabolismo de carboidratos em animais treinados incluem aumento do RNAm e da proteína GLUT4, melhorando o influxo de glicose para os músculos, assim como aumento na atividade das enzimas glicogênio sintase e hexoquinase (Pedersen e Saltin, 2006).

A Tabela 06 demonstra menor concentração de TNF muscular e aumento no conteúdo de glicogênio muscular e hepático nos animais exercitados controles em relação aos seus pares sedentários. Assim, o paradigma de 06 semanas de exercício regular de natação foi capaz de promover efeito antiinflamatório (Almeida, Gomes-Filho *et al.*, 2009) e melhora de aptidão muscular (Oh-Ishi, Kizaki *et al.*, 1996), conforme tem sido relatado na literatura.

Porém, quando os animais foram submetidos à indução da EAE esse efeito benéfico foi abolido, com os conteúdos de glicogênio muscular e hepático tendo voltado para valores similares aos dos animais sedentários. E adicionalmente, ambos os grupos EAE apresentaram menor massa muscular e menor conteúdo das citocinas nesse tecido em relação aos controles, provavelmente em resposta ao menor conteúdo protéico muscular. Como não foi quantificada a proteína muscular total, ficamos limitados a qualquer conclusão adicional.

As alterações musculares no modelo EAE em ratos Lewis foram investigadas em alguns estudos. Dados anteriores mostraram reduzida perfusão do leito capilar no início da paralisia e esse efeito foi mais evidente nos músculos vermelhos (Wiernsperger e Honegger, 1981). Os autores então sugeriram que a atrofia muscular estaria associada à disfunção do metabolismo oxidativo. Se este fato também é verdadeiro para os animais do presente estudo, explica-se a menor massa muscular dos nossos animais e menor conteúdo de glicogênio, apesar do efeito neste último possa ter sido mais evidente entre os animais exercitados.

Posteriormente, observou-se redução de massa corporal associada à perda de 40-50% na massa do músculo gastrocnêmico, iniciando-se aos 10 dias após a indução, refletindo em menor área transversa de todos os tipos de fibras, ou seja, aeróbias, de metabolismo intermediário e anaeróbias (De Haan, Van Der Vliet *et al.*, 2004). Músculos de animais saudáveis que foram denervados por 3 dias apresentaram reduzida absorção de glicose estimulada por insulina bem como redução no conteúdo de GLUT-4 (Megney, Neuffer *et al.*, 1993), corroborando a disfunção do metabolismo oxidativo neste tecido. Por outro lado, foi

demonstrado previamente que o aumento no conteúdo de glicogênio em músculo sóleo de ratos juvenis exercitados pelo paradigma da roda voluntária ocorreu já após 4 semanas de exercício (Henriksenand e Halseth, 1994). Estas informações nos dão suporte para sugerir que os animais exercitados EAE do presente estudo possam ter sofrido uma depleção das reservas de glicogênio após a instalação da doença, ou seja, 10 dias após a indução.

Recentemente, mudanças morfológicas e moleculares musculares foram investigadas no modelo EAE e foram observadas atrofia de fibras com aumento da marcação TUNEL e dos níveis de caspase-12, de fatores de transcrição relacionados com inflamação, de enzimas associadas com vias pro inflamatórias e de ubiquitina (Park, Nozaki *et al.*, 2012).

Estes estudos sugerem um impacto da excitação neuromuscular prejudicada como fator para a perda muscular na EAE. De fato, a perda de neurônios motores inferiores tem sido observada tanto na EAE quanto na EM (Vogt, Paul *et al.*, 2009). Uma vez que esse mecanismo de falência na condução neural é transitório, sugere-se que a atividade muscular preservada durante doença poderia prevenir a atrofia muscular e atenuar a sensação de fadiga (De Haan, Van Der Vliet *et al.*, 2004).

Notamos que a perda ponderal foi menor nos animais exercitados (Figura 03) e, além disso, foi recuperada mais rapidamente (Figura 06) nesses animais. Como os efeitos sobre a atrofia muscular nos ratos Lewis foram acompanhado da perda ponderal (De Haan, Van Der Vliet *et al.*, 2004), poderíamos sugerir que nossos animais exercitados recuperaram a função muscular mais eficientemente que os sedentários durante a remissão da EAE? Considerando que não coletamos esse tecido e não fizemos as dosagens metabólicas no período de remissão, podemos apenas sugerir tais hipóteses a partir dos dados de massa corporal.

Os processos neuropatológicos associados à lesão observada no EAE incluem a inflamação no SNC, a desmielinização e o dano axonal. Estes componentes serão mais ou menos proeminentes dependendo da fase ou estágio clínico da lesão. Em verdade, o modelo

EAE induzido por MOG₃₅₋₅₅ tanto em camundongos NOD quanto em C57Bl6J é caracterizado por ter a paralisia do primeiro surto associada principalmente à inflamação, sendo que desmielinização e dano axonal, discretos nessa fase, progridem adicionalmente com o avançar da doença e são considerados como os responsáveis pelo prejuízo clínico crônico (Onuki, Ayers *et al.*, 2001; Pham, Doerrbecker *et al.*, 2011; Reeks, Addicks *et al.*, 2011).

É importante observar que embora existam alguns trabalhos avaliando o efeito do exercício físico sobre a resposta clínica da EAE, não há relato na literatura propondo se o exercício tem ou não a capacidade de alterar o recrutamento de leucócitos no primeiro surto ou modificar a progressão da desmielinização e do dano axonal.

Iniciamos nossos estudos por uma investigação do perfil inflamatório no SNC dos animais EAE na fase aguda da doença. Uma vez que as interações entre leucócitos e o SNC iniciam-se na barreira hematoencefálica, mais especificamente com o endotélio (Vajkoczy, Laschinger *et al.*, 2001), nosso foco de estudo foi investigar essas interações por meio da análise *in vivo* de eventos de rolamento e adesão na microvasculatura do SNC. Dados prévios do nosso grupo demonstraram que animais deficientes para o receptor de bradicinina apresentam uma atenuação do escore clínico de animais EAE induzidos por MOG₃₅₋₅₅ associada com menor número de eventos de adesão da microvasculatura cerebral (Dos Santos, Roffe *et al.*, 2008).

No intuito de investigar se a apresentação clínica atenuada apresentada no experimento A (Figura 02) foi associada com menor recrutamento de leucócitos para o SNC ao longo do desenvolvimento da EAE, realizamos análise dos parâmetros de rolamento e adesão leucocitária na microvasculatura cerebral e da medula espinhal em animais sedentários e exercitados. Adicionalmente, cérebro e medula espinhal foram investigados por parâmetros histopatológicos. Inicialmente, ao avaliar os grupos EAE, encontramos um maior

recrutamento de leucócitos na microvasculatura medular em relação à cerebral nos maiores escores clínicos, independente da condição sedentarismo ou exercício (Figuras 09 e 10).

Este resultado estaria de acordo com estudos recentes que têm demonstrado que apesar do plexo coróide ser uma importante rota de entrada de células no SNC, no modelo EAE (Reboldi, Coisne *et al.*, 2009), ela talvez não seja a primeira. Foi demonstrado um acúmulo de células T encefalitogênicas na região lombar da medula espinhal de camundongos C57Bl6J já nos primeiros cinco dias após a transferência destas células sem concomitante acúmulo no plexo coróide (Arima, Harada *et al.*, 2012). Estes autores sugeriram que este resultado estaria intimamente relacionado à diferenciada ativação neural sensorial desta região nos camundongos que seria transformada em um sinal inflamatório.

Outro estudo mostrou, no pico da doença, um aumento na permeabilidade vascular medular, mas não cerebral, em camundongos C57Bl/6 injetados com MOG₃₅₋₅₅ (Bennett, Basivireddy *et al.*, 2010). Assim, os resultados destes estudos suportam nossos achados de maior recrutamento de células da região medular em relação à cerebral.

Por outro lado, nossos dados demonstraram não haver diferenças entre os grupos EAE sedentários e exercitados tanto pelos parâmetros de rolamento e adesão (Figuras 07 e 08), quanto pelos parâmetros histopatológicos (Figuras 11 e 12). Os primeiros estudos com EAE e exercício em ratos Lewis sugeriram que o exercício poderia alterar atividade das células apresentadoras de antígenos, diminuir a proliferação de células T encefalitogênicas e/ou atrasar o infiltrado de células T efectoras para o SNC (Le Page, Ferry *et al.*, 1994). Posteriormente, para o modelo de EAE de transferência passiva (em que apenas a migração é presente) os autores sugeriram que o exercício exaustivo, realizado por dois dias após a indução, promoveria simplesmente um atraso no infiltrado de células T efectoras para o SNC (Le Page, Bourdoulous *et al.*, 1996). Assim, nosso estudo é o primeiro relato a abordar o recrutamento de leucócitos, na fase aguda da doença e demonstrar que a atenuação clínica na

EAE promovida pelo exercício, não está associada com atraso ou diminuição do infiltrado inflamatório tanto no cérebro quanto na medula espinhal.

Para adicionalmente investigarmos os efeitos do exercício de natação na possível modulação destas células, avaliamos o perfil de citocinas no cérebro e na medula espinhal na fase de desenvolvimento da EAE (10 e 14 dpi). O grupo das citocinas selecionados incluiu TNF e IL-1 β (pró-inflamatórias), IL-6 (regulação da inflamação) e IL-10 (antiinflamatória). Estas citocinas foram escolhidas por serem as mais frequentemente avaliadas nos estudos sobre os efeitos no exercício em pacientes portadores de EM (Dalgas e Stenager, 2012). Além disso, IL-1 β , IL-6 e TNF são classicamente reconhecidas por serem responsáveis pela ativação de sinais clínicos em doenças infecciosas e inflamatórias (Abbas, Lichtman *et al.*, 2011). Posteriormente, analisamos também o perfil das células recrutadas para a medula espinhal na fase de remissão e na fase crônica da doença pelo método de citometria de fluxo (Figuras 17 a 21).

Exceto pela concentração cerebral de IL-6 (Figura 14-B), os camundongos EAE sedentários mostraram redução significativa em todas as outras citocinas entre 10 e 14 dpi tanto no cérebro quanto na medula espinhal. Uma vez que estes animais não foram perfundidos com solução salina para limpeza do sangue, este resultado pode ser atribuído aos leucócitos circulantes, uma vez que a contagem destas células apresentou padrão similar de resposta (Figura 13). Este resultado também estaria de acordo com dados anteriores que sugeriram que o pico da expressão gênica de diversas citocinas acontece no período de início dos sinais clínicos (Eng, Ghirnikar *et al.*, 1996).

Assim, se considerarmos o 10º dpi como dia de pico das respostas das citocinas analisadas no nosso estudo, observamos um padrão de resposta antiinflamatória no cérebro dos animais EAE exercitados, sobretudo com relação às concentrações de TNF (Figura 14-A), IL-1 β (Figura 14-B), que talvez tenha refletido na menor necessidade de produção de IL-10

(Figura 14-D). Por outro lado, como a IL-6 não se alterou entre 10 e 14 dpi para os animais sedentários e diminuiu entre esses dias para os animais exercitados, essa possível resposta antiinflamatória é observada em 14dpi para IL6 (Figura 14-B).

De modo interessante, na medula espinhal, os animais EAE exercitados mostraram aumento de TNF (Figura 15-A), IL-6 (Figura 15-B) e IL-10 (Figura 15-D) em 14 dpi em relação aos pares sedentários, demonstrando, assim, a geração de um ambiente pró-inflamatório nesta região do SNC. É importante notar que esta resposta ocorreu mesmo sem diferenças na circulação ou no recrutamento de leucócitos para medula espinhal, o que sugere por um lado que as fontes destas citocinas podem ser outras células tais como as endoteliais, micróglia, astrócitos e / ou mesmo neurônios (Eng, Ghirnikar *et al.*, 1996; Figiel, 2008). Por outro lado, estes resultados também sugerem que essas citocinas produzidas nos animais EAE exercitados tem outras funções, que não seja diretamente a expressão de moléculas de adesão mediadores da interação leucócito endotélio.

Como estas citocinas têm apresentados resultados conflitantes na literatura ao se comparar abordagens sistêmicas e neuro-imuno-modulatórias e, sobretudo no modelo EAE, passaremos a discutir os resultados observados neste estudo para cada citocina isoladamente.

A **IL-1 β** é uma citocina pro - inflamatória clássica produzida principalmente por macrófagos e células endoteliais e está associada à ativação endotelial, febre e síntese de proteínas da fase aguda (Abbas, Lichtman *et al.*, 2011). Nos animais sedentários EAE, a IL-1 β aumentou em 10 dpi e reduziu para valores similares aos animais controles em 14 dpi tanto no cérebro, quanto na medula. Nos animais exercitados EAE, esta variação não ocorreu na medula e foi menos acentuada no cérebro. Como resultado final, observamos uma resposta antiinflamatória promovida pelo exercício no tecido cerebral, sobretudo no 10º dpi. Sugere-se que uma sessão exaustiva de exercício aumenta a produção desta citocina no SNC, mas parece que o exercício regular teria o efeito oposto, reduzindo seus níveis (Packer, Pervaiz *et al.*,

2010). Além disso, aumentos centrais de IL-1 β têm sido associados à anorexia e à caquexia e sua redução está associada ao controle desta condição, sendo este um dos mecanismos propostos pelos quais o exercício poderia atenuar o desenvolvimento de caquexia (Donohoe, Ryan *et al.*, 2011). Assim, este resultado fornece algum respaldo à perda de massa corporal atenuada nos animais EAE exercitados do presente estudo e sugere um possível efeito contra desenvolvimento de comportamento doentio nesses animais.

A IL-6 foi inicialmente definida como uma citocina pro - inflamatória, sendo produzida por macrófagos, células endoteliais e linfócitos T e estando associada à síntese de proteínas da fase aguda e à proliferação de linfócitos B (Abbas, Lichtman *et al.*, 2011). Esta citocina apresentou-se em menor concentração nos animais exercitados EAE em relação aos sedentários no14 dpi no cérebro e no10 dpi na medula. No entanto, a medula espinhal analisada no14 dpi mostrou resultado oposto. Atualmente, sabe-se que a IL-6 é necessária para a diferenciação (Bettelli, Carrier *et al.*, 2006) e recrutamento (Reboldi, Coisne *et al.*, 2009; Arima, Harada *et al.*, 2012) das células T_H17 encefalitogênicas e que estas células são importantes fontes adicionais de IL-6 e TNF (Langrish, Chen *et al.*, 2005). Sendo assim, a redução da IL-6 aos 14 dpi no cérebro dos animais EAE exercitados em comparação aos sedentários, pode ser um mecanismo para o controle da resposta T_H17 nesta região do SNC. Por outro lado, em pacientes que sofreram grave trauma cerebral, observou-se aumento sérico e no fluido cérebro-espinhal de IL-6 e IL-10 associados ao aumento na produção de fator neurotrófico neural (NGF) e sugeriu-se que a inflamação aguda poderia promover reparo das lesões no SNC, assim como regeneração axonal (Morganti-Kossmann, Lenzlinger *et al.*, 1997).

A IL-10 foi identificada como uma proteína que inibe a produção de Interferon- γ (por células T_H1) e a ativação de células T finalizando reações imunológicas, sendo preferencialmente produzida por células T reguladoras (Abbas, Lichtman *et al.*, 2011). Nos animais sedentários EAE, a IL-10 aumentou em 10 dpi e reduziu para valores similares aos

animais controles em 14 dpi no cérebro, mas apenas reduziu em 14 dpi na medula. Nos animais exercitados EAE, esta variação não ocorreu. A concentração de IL-10 inalterada no cérebro dos animais exercitados EAE sugere a ausência de regulação positiva de células T reguladoras neste tecido (Von Boehmer, 2005). Por outro lado, a concentração de IL-10 foi significativamente maior aos 14 dpi nos animais EAE exercitados em relação aos sedentários na medula espinhal. E como podemos observar na Figura 18, houve uma tendência de aumento no número de células T reguladoras aos 21 dpi nos animais exercitados em relação aos sedentários do experimento B. É importante observar que tem sido proposto o papel da IL-10 na atenuação dos danos causados pelas citocinas pró-inflamatórias e possível atuação na regeneração e sobrevivência neuronal (Morganti-Kossmann, Lenzlinger *et al.*, 1997).

O TNF ou fator de necrose tumoral é uma citocina produzida por macrófagos e células T e está relacionado com ativação endotelial, febre, síntese de proteínas da fase aguda, catabolismo e apoptose (Abbas, Lichtman *et al.*, 2011). Neste caso, o efeito antiinflamatório do nosso paradigma de exercício foi inicialmente demonstrado pela concentração reduzida de TNF no SNC dos animais exercitados no grupo de controle em relação aos controles sedentários (Figuras 12-A e 13-A), sendo este resultado corroborado por dados da literatura (Ang, Wong *et al.*, 2004). Ao analisarmos os dados dos animais sedentários EAE, verificamos aumento em 10 dpi com diminuição para abaixo dos níveis controle nos animais sedentários aos 14 dpi no cérebro, mas apenas a diminuição na medula nos 14 dpi. Estas alterações foram atenuadas no cérebro dos animais exercitados, porém como para outras citocinas, houve maior concentração de TNF na medula espinhal dos animais exercitados EAE aos 14 dpi, quando comparados aos sedentários. Assim como a IL-6, o TNF tem apresentado resultados conflitantes com relação a ser uma molécula degenerativa ou protetora tanto na EAE quanto na EM. Este dado provavelmente advém do fato de esta molécula atuar em dois receptores distintos com respostas antagônicas (Brambilla, Ashbaugh *et al.*, 2011).

As respostas observadas no tecido cerebral sugerem uma proteção não necessariamente relacionada com as células T reguladoras ou polarização de T_H1 para T_H2 (Batoulis, Addicks *et al.*, 2010; El-Behi, Rostami *et al.*, 2010). Mas uma observação generalizada dos níveis de citocinas sugere que o exercício prévio de natação parece ter um efeito antiinflamatório neste tecido.

Uma resposta totalmente diferente foi observada na medula espinhal. Seis semanas de exercício regular de intensidade moderada melhoraram as funções imunológicas, aumentando as citocinas pró-inflamatórias e a imunidade antigênica específica em camundongos vacinados por antígeno para hepatite B (Wang, Song *et al.*, 2011). Uma vez que observamos maior recrutamento de células na medula espinhal, podemos sugerir que resposta gerada pelo exercício de natação em nosso estudo potencia a atividade inflamatória na medula, a qual é o alvo de lesões desmielinizantes no EAE induzido por MOG₃₅₋₅₅.

Como podemos observar na Figura 20, houve uma tendência de aumento no número de células natural killer e células T reguladoras aos 21 dpi. Estas duas células são importante fonte produtora das citocinas aqui listadas e ambas estão associadas a eventos protetores contra a EAE (Gold, Linington *et al.*, 2006). É importante notar que os animais do Experimento "B" apresentaram um perfil tardio de apresentação clínica de três dias em relação aos animais do experimento "A". Ou seja, o dia 21 para os animais da citometria de fluxo representaria o dia 17 para os animais usados na análise de citocinas. Sendo assim, podemos estar olhando para um efeito já tardio na citometria que possa ter sido evidente nos animais exercitados durante o pico da doença.

Os dados em conjunto sugerem que o efeito do exercício gerou resposta específica após a indução da EAE já que o grupo controle exercitado não apresentou uma reação similar de aumento das citocinas medulares.

Ao observarmos a Figura 17, notamos uma tendência de redução na contagem de células viáveis, coradas com *Tripan-Blue*, a partir de homogenato da medula espinhal nos animais sedentários entre 21 e 42 dpi, sendo que esta tendência foi significativa para os animais exercitados. Este fato levou a uma diferença significativa entre o número de células contadas entre sedentários e exercitados aos 42 dpi. Anteriormente, demonstrou-se que não houve diferença em infiltrados celulares na medula espinhal e estriado de animais EAE aos 50dpi submetidos ou não ao exercício voluntário (Rossi, Furlan *et al.*, 2009).

As discrepâncias observadas entre o nosso estudo e o citado podem ser explicadas a partir de algumas observações. Primeiro porque os protocolos de exercício empregados foram diferentes uma vez que os animais daquele estudo realizaram exercício voluntário, iniciado após a indução e mantido por todo o período analisado. Os métodos de investigação da celularidade utilizados também foram diferentes, sendo que no estudo citado foram feitas investigações qualitativas pela coloração HE e, apesar de realizarem imunohistoquímica para CD4 e CD8, nenhuma método quantitativo foi empregado na medula espinhal, local onde os infiltrados foram mais evidentes.

Aliás, em nosso estudo a redução na quantidade total de células contadas refletiu exatamente em menor número de células T CD4 e CD8, além de células B, nos animais exercitados em relação aos sedentários aos 42 dpi (Figura 21).

As **células B**, além de produzirem anticorpos, regulam as respostas imunes e atuam como coadjuvantes às células CD4 produzindo citocinas que regulam a inflamação e a própria função das células T (Abbas, Lichtman *et al.*, 2011). Ensaios clínicos em pacientes com EM, usando depleção de células B têm demonstrado eficácia para o tratamento da mesma (Matsushita, Horikawa *et al.*, 2010). Acredita-se que o modelo EAE em camundongos C57BL/6 induzido por MOG₃₅₋₅₅ murino apresente mecanismo independente de células B para seu desenvolvimento (Oliver, Lyon *et al.*, 2003), o que está em acordo com nossos dados

de poucas células B recrutadas aos 21 dpi (Figuras 18 e 20). No entanto, estudos anteriores sugerem papel destas células na fase crônica da EAE, possivelmente facilitando a remielinização e reparo tecidual (Carmody, Hilliard *et al.*, 2002).

As **células CD4**, também chamadas de auxiliares, atuam na diferenciação das células B e na ativação de macrófagos atuando sobretudo via complexo principal de histocompatibilidade classe II, o MHC II (Abbas, Lichtman *et al.*, 2011). Foi demonstrado que estas células são responsáveis por iniciar o ataque inflamatório na EM (Mcfarland e Martin, 2007).

As **células CD8**, também chamadas de citotóxicas, atuam na destruição de células infectadas atuando via MHC I (Abbas, Lichtman *et al.*, 2011). Assim, acredita-se que elas amplificam o dano ao tecido por afetar diretamente mielina e axônios (Mcfarland e Martin, 2007). Dados recentes sugerem que o MHC I pode ser induzido nos neurônios e oligodendrócitos desafiados e que as células CD8 sejam os efetores das lesões na EM (Batoulis, Addicks *et al.*, 2010). Aliás, o papel das células CD8 positivas na EM ainda é assunto de intenso debate, uma vez que tem sido observado maior infiltrado destas células em detrimento das CD4 positivas em algumas lesões (Lassman, 1999). Sendo assim, esse resultado pode estar associado à menor progressão da desmielinização e do dano axonal da fase aguda para a fase crônica nos animais exercitados EAE do presente estudo.

As citocinas TNF, IL-1 β e IL-6 aumentadas em combinação com a diminuição do suporte trófico vindo do BDNF para os neurônios, resultam em apoptose neuronal no modelo de lesão medular (Basso e Hansen, 2011). No entanto, há um corpo forte de evidências que apoiam o conceito de que a inflamação no SNC pode ter efeitos tanto destrutivos quanto benéficos (Hohlfeld, Kerschensteiner *et al.*, 2007). Por exemplo, a descoberta de produção local de fatores neurotróficos por leucócitos em lesões de EM (Kerschensteiner, Gallmeier *et*

al., 1999), sugerem papel adicional dos leucócitos infiltrados em regeneração e reparo tecidual.

Em nosso estudo, observou-se um aumento dos níveis de BDNF em ambos os homogeneizados, de cérebro e da medula espinhal dos animais exercitados em relação aos sedentários-EAE no 14dpi. Estes dados sugerem uma redução dos danos na medula espinhal, apesar do ambiente global aparentemente pró-inflamatório e um perfil diferente em comparação com o cérebro.

Apesar de não se ter um acordo se a concentração de BDNF estaria aumentada ou diminuída na fase estável da EM, sabe-se que durante os surtos, sua concentração está aumentada (Sarichielli, Greco *et al.*, 2002), sugerindo uma possível associação com a resposta inflamatória da doença. Por outro lado, uma correlação inversa entre os níveis de BDNF séricos e lesões mensuradas por imagem de ressonância magnética foi estabelecida (Comini-Frota, Rodrigues *et al.*, 2012). Estes resultados sugerem que estratégias capazes de aumentar a concentração de BDNF durante o pico da doença poderiam ter papel neuroprotetor.

Alguns estudos demonstraram efeitos de uma sessão de exercício (Gold, Schulz *et al.*, 2003), ou períodos de três ou quatro semanas de exercício (Castellano e White, 2008; Bansi, Bloch *et al.*, 2012), os quais foram capazes de aumentar os níveis séricos de BDNF em pacientes EM. No entanto, estes estudos foram realizados com pacientes na fase estável e, ainda não se sabe se o exercício regular nestes pacientes teria a capacidade de aumentar a concentração de BDNF durante o surto da doença. Além disso, recente revisão da literatura sugere que os resultados obtidos até o momento com relação à BDNF e EM são meramente descritivos e que estudos funcionais em modelos animais necessitam ser realizados, sobretudo investigando a desmielinização (Luhder, Gold *et al.*, 2013). Considerando que BDNF tem uma meia-vida curta e a sua eficácia no SNC é limitado pela barreira hemato-encefálica,

diversas estratégias tem sido investigadas no intuito de otimizar a disponibilidade deste fator no local de lesão.

Estudos *in vitro* demonstraram aumento na produção de BDNF por células T CD4+ após tratamento com acetato de glatiramer (GA) e estas células foram capazes de estimular a produção de células progenitoras de oligodendrócitos *in vitro* (Skihar, Silva *et al.*, 2009). Ao estudar os efeitos do GA *in vivo*, estes autores observaram aumento de BDNF nas lesões o qual pode estar associado com remielinização em uma condição experimental de desmielinização induzida por lisolecitina. Em outro estudo, células estaminais da medula óssea foram utilizadas como veículo para liberação de BDNF diretamente ao SNC de animais EAE (Makar, Bever *et al.*, 2009). Esses animais demonstraram atraso e atenuação clínica, sendo que o exame histopatológico mostrou desmielinização reduzida e remielinização aumentada. Estes estudos corroboram a idéia do BDNF como possível fator benéfico associado à EM.

Assim, investigamos os parâmetros associados a progressão da desmielinização nestes animais. Nossos resultados mostraram aumento gradativo no volume de desmielinização entre a fase aguda (14 dpi) e crônica da doença (42 dpi), entre os animais sedentários com menor progressão dessa desmielinização entre os animais exercitados (Figura 22). Foi evidente também o menor volume de desmielinização nos animais exercitados em relação aos sedentários no 42 dpi, resultados confirmados pela análise quantitativa do volume de desmielinização por princípios de Cavalieri (Figura 23).

Tem sido reportado que esta proteção pode ocorrer por aumento da proliferação de células precursoras de oligodendrócitos (OPC) e a sua maturação em oligodendrócitos, resultando em aumento da remielinização (McTigue, Horner *et al.*, 1998; Du, Fischer *et al.*, 2003; Skihar, Silva *et al.*, 2009; Van't Veer, Du *et al.*, 2009). Os oligodendrócitos são células importantes em formar a bainha de mielina, cujas funções neurofisiológicas são aumentar a

velocidade da condução do impulso e fornecer suporte trófico aos axônios para manter sua sobrevivência (Griffiths, Klugmann *et al.*, 1998).

No entanto, ao contarmos as células marcadas para CC1, oligodendrócitos maduros, não observamos diferenças entre os animais sedentários e exercitados aos 42 dpi de EAE (Figuras 26 e 27). Além disso, a contagem das células duplamente marcadas para NG2/PDGFR α , as OPCs, revelou menor número de células progenitoras na substância branca dos animais exercitados (Figuras 24 e 25). Estes dados sugerem que não foi via aumento no número de células que o exercício conferiu proteção contra a progressão da desmielinização nos animais EAE.

A desmielinização, com e sem a perda de oligodendrócitos, tem sido descrita na EM (Lucchinetti, Bruck *et al.*, 1996) e na EAE (Wu, Ohlsson *et al.*, 2008). Neste sentido, tem sido sugerido que vias distintas imunológicas e citotóxicas como as citocinas, os anticorpos desmielinizantes, e a cito toxicidade mediada por células com apoptose pode ser responsável por diferentes padrões de desmielinização. Por exemplo, estudos de imunofluorescência com dupla marcação mostrou freqüente co-localização de marcadores para apoptose com MBP, mas ausência de co-localização com CC1 nos corpos celulares de oligodendrócitos, sugerindo a degeneração ativa de processos dos oligodendrócitos, mas não de seus corpos na substância cinzenta (Wu, Ohlsson *et al.*, 2008).

Sendo assim, para adicionalmente investigar os efeitos o exercício sobre mecanismos associados à desmielinização, foram dosadas as proteínas da mielina PLP e MBP (Figuras 28 e 29, respectivamente). Neste caso, não foram observadas diferenças entre os animais sedentários e exercitados EAE para MBP. Contudo, houve maior concentração de PLP no grupo exercitado tanto em 20 quanto em 43 dpi, sugerindo proteção da perda de processos de oligodendrócitos nos animais exercitados. Este dado corrobora o resultado de menor volume de desmielinização por LFB e, associado ao menor número de OPCs na substância branca dos

animais exercitados, sugere que o efeito do exercício prévio foi em proteger contra a progressão da desmielinização mais do que promover remielinização.

O menor recrutamento de células B, importantes no processo de remielinização durante a fase crônica da EAE induzida por MOG (Carmody, Hilliard *et al.*, 2002), suporta essa hipótese. Ou seja, uma vez que os animais exercitados estavam menos desmielinizados, os processos de remielinização foram atenuados.

PLP é a principal proteína estrutural do sistema nervoso central e sua redução tem sido associada à desmielinização (Trapp, Peterson *et al.*, 1998). MBP é a segunda principal proteína estrutural do sistema nervoso central e sua diminuição também está associada com desmielinização (Griffiths, Klugmann *et al.*, 1998). No entanto, em um elegante artigo para a revista *Science*, estes autores mostraram que na ausência de PLP, os camundongos desenvolvem subsequente dano axonal, o que não acontece nos animais deficientes para MBP, apesar da desmielinização aparente. Animais duplamente mutantes (PLP e MBP) apresentaram tanto desmielinização quanto dano axonal, sugerindo a necessidade do suporte trófico oligodendroglial para a sobrevivência dos neurônios, sendo que a proteína PLP teria um papel mesmo que indireto nessa modulação.

É importante notar que, em adição aos efeitos benéficos sugeridos no controle da desmielinização (Makar, Bever *et al.*, 2009; Skihar, Silva *et al.*, 2009), recente revisão da literatura sugere que o papel neuroprotetor do BDNF na EM pode estar associado à regeneração e crescimento de neurônios danificados, bem como à regulação na liberação de neurotransmissores e crescimento de espinhas dendríticas (De Santi, Annunziata *et al.*, 2009).

Tem sido sugerido também que a própria proteção contra perda de oligodendrócitos ou aumento no reparo de mielina poderia reduzir a taxa de dano axonal e neuronal (Zhang, Kramer *et al.*, 2011) e diminuir a gravidade da doença, melhorando a qualidade de vida dos pacientes (Hasseldam e Johansen, 2010). Neste caso, sugere-se uma relação entre dano axonal

e os processos de desmielinização, uma vez que foram observados que os oligodendrócitos mantidos vivos tentam continuamente remielinizar os axônios desmielinizados, mas que os axônios já desmielinizados são seccionados e os danos permanentes tornam-se evidentes na EM (Trapp, Peterson *et al.*, 1998) e no modelo EAE (Wujek, Bjartmar *et al.*, 2002). Tendo em vista nossos resultados de atenuação dos sinais clínicos associados ao maior conteúdo de BDNF na medula na fase aguda, com menor progressão do volume de desmielinização na fase crônica, na próxima etapa realizamos uma prévia investigação sobre o perfil do dano axonal nos animais EAE exercitados.

E, de modo similar ao que observamos com relação ao volume de desmielinização, podemos notar o aumento gradativo do dano axonal entre a fase aguda (14 dpi) e crônica da doença (42 dpi) entre os animais sedentários com menor progressão desse dano axonal nos animais exercitados (Figura 30). A evidência de menor dano axonal nos animais exercitados em relação aos sedentários aos 42 dpi, foi confirmada pela quantificação protéica do neurofilamento SMI-32, por western blot (Figura 31).

Os neurofilamentos são o principal constituinte do citoesqueleto axonal, sendo que o processo de mielinização aumenta a fosforilação destas proteínas e, ao contrário, a desmielinização leva a uma diminuição do estado fosforilado dos neurofilamentos. Assim, à medida que a desmielinização progride, observa-se maior número de axônios positivos para SMI-32 em pacientes com EM (Trapp, Peterson *et al.*, 1998). Este estudo sugeriu que os axônios desmielinizados ficam mais vulneráveis ao ambiente inflamatório e sofrem a transecção, apesar de dano axonal primário também ter sido descrito.

De qualquer forma, a resposta neurobiológica ao dano axonal é a tentativa de remodelação com crescimento da porção distal do axônio, assim como pelo brotamento de novos neuritos dos neurônios ao redor da lesão (Petratos, Ozturk *et al.*, 2012). Porém, alguns fatores protéicos do próprio SNC inibem essas respostas compensatórias, causando uma

inibição da regeneração, sendo que o Nogo-A (inibidor do crescimento de neuritos) é reconhecidamente o mais potente inibidor.

A relação entre Nogo-A e BDNF no hipocampo foi investigada previamente em animais submetidos a protocolo de lesão cerebral e três dias de corrida voluntária (Chytrova, Ying *et al.*, 2008). Neste estudo observou-se que enquanto lesão cerebral aumentou Nogo-A, o exercício diminuiu. Por outro lado, exercício aumentou BDNF, PKA, proteína 43 associada ao crescimento (GAP-43) e sinaptofisina, ou seja, as proteínas associadas ao crescimento e regeneração axonal. Um dado importante deste estudo é que os autores estabeleceram significativas e altas correlações entre as proteínas analisadas que permitiram a elaboração de uma hipótese, na qual sugere que o aumento na produção de BDNF causado pelo exercício no SNC dos animais lesionados leva a uma inibição na via de sinalização do Nogo-A e, assim, facilita duplamente a regeneração neural.

Rossi *et al* (2009), sugeriram que o exercício voluntário exerce efeitos neuroprotetores diretos no modelo EAE, pois restaurou a diminuição da sensibilidade das sinapses gabaérgicas e atenuou a perda de espinhas dendríticas no estriado, sem alterar o infiltrado inflamatório aos 50 dpi.

Nossos resultados sugerem o desencadeamento de efeitos neuroprotetores somados aos efeitos antiinflamatórios pelo exercício frente à resposta neuropatológica observada no EAE, mesmo quando o exercício foi realizado sob paradigma forçado e finalizado antes da progressão da doença. Como nossos animais finalizaram o protocolo de exercício aos 10 dpi, podemos sugerir uma interação entre a modulação promovida pela aptidão física das seis semanas de natação com as respostas neuroinflamatórias do EAE, e consequentemente se observa a modificação da progressão da EAE ao longo dos 42 dias.

Essas evidências foram suportadas pelos resultados de atenuada apresentação clínica acompanhada de redução da progressão de desmielinização e dano axonal na fase crônica da

CONCLUSÕES

Os principais achados deste estudo incluem diferenças nos parâmetros clínicos da EAE quando avaliados tanto na fase aguda quanto na fase crônica com atenuação e atraso dos sinais clínicos nos animais EAE que se exercitaram em relação aos mantidos sedentários por todo o período experimental. Embora este resultado tenha sido acompanhado por atenuação da perda ponderal, as alterações metabólicas não foram modificadas pelo exercício. Na fase aguda da doença, os animais EAE exercitados e sedentários apresentaram semelhante perfil de infiltrado inflamatório, desmielinização e dano axonal com diferenças significativas, porém, nos níveis de citocinas e BDNF. Enquanto as citocinas diminuíram no cérebro e aumentaram na medula espinhal, BDNF aumentou nos dois compartimentos dos animais exercitados em relação aos sedentários com EAE. Na fase crônica da EAE observamos diminuído recrutamento de células CD4+, CD8+ e linfócitos B, de volume de desmielinização e dano axonal na medula espinhal dos animais exercitados em relação aos sedentários.